



# **Caracterización de la actividad anticlostridial de cepas de *Lacticaseibacillus* y evaluación de su efectividad en quesos**

**Lic. Bq. (MSc.) Jorge Olivera Rodi**

**Doctorado en Biotecnología**

**Tutor: Dr. Hugo Mario Naya Monteverde**

**Co-tutora: Dra. Marcela González Ramos**

**Unidad de Tecnología de los Alimentos  
Facultad de Agronomía**

**2025**

## Resumen

El defecto de hinchazón tardía es una de las principales causas de deterioro en quesos duros y semiduros, afectando su calidad y valor comercial. Este defecto es provocado por especies de *Clostridium* (*C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes*, *C. butyricum* y *C. beijerinckii*) durante la etapa de maduración quesera, en la cual las esporas clostridiales germinan y las células vegetativas fermentan lactato produciendo gases ( $H_2$  y  $CO_2$ ) que se acumulan en la masa del queso, originando ojos irregulares, rajaduras y abombamiento de la forma. También es frecuente la ocurrencia de aromas desagradables y sabor rancio por los ácidos orgánicos generados. Los métodos convencionales aplicados por la industria para prevenir esta alteración no son completamente efectivos, por lo que se buscan estrategias alternativas como la utilización de cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) inhibitorias de *Clostridium*, como cultivos adjuntos en la elaboración quesera. El objetivo general de este trabajo fue estudiar el potencial anticlostridial de las cepas 26 y 95 de *Lacticaseibacillus*, provenientes de productos lácteos, y evaluar su efectividad como cultivos biopreservantes en la elaboración de queso. En la primera etapa del trabajo, se realizaron estudios *in vitro* para determinar la compatibilidad de las cepas 26 y 95 con cepas BAL iniciadoras comerciales, y el proceso de producción quesera. Las cepas evaluadas no afectaron el desarrollo de las cepas BAL comerciales, ni produjeron cantidades detectables de gas por fermentación de carbohidratos. Además, las cepas 26 y 95 toleraron las concentraciones de sal empleadas en el proceso de elaboración. Estos resultados sugieren que las cepas mantendrían su viabilidad en el queso y no generarían defectos en las características sensoriales del producto. En la siguiente etapa se elaboraron quesos tipo Dambo a nivel experimental, en los cuales se evaluó la efectividad de las cepas para inhibir el desarrollo de *Clostridium* durante el período de maduración. De acuerdo a los resultados microbiológicos y fisicoquímicos obtenidos, ambas cepas lograron inhibir el crecimiento de *C. tyrobutyricum* y prevenir la aparición de hinchazón tardía, sin alterar las propiedades fisicoquímicas del producto final. Estos resultados respaldarían el potencial de dichas cepas como cultivos biopreservantes compatibles con el proceso de elaboración quesera. Finalmente, las cepas 26 y 95 fueron identificadas por secuenciación del genoma completo, y mediante análisis bioinformáticos se buscaron determinantes genéticos de importancia para el uso biotecnológico de las cepas en la producción de alimentos. Se logró identificar a la cepa 26 como *Lacticaseibacillus zeae* subsp. *silagei*, y a la cepa 95 como *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*. El análisis bioinformático de los genomas bacterianos no detectó genes asociados a resistencia a compuestos antimicrobianos ni genes codificantes para factores de virulencia, lo que sugiere que las cepas 26 y 95 serían inocuas para el ser humano. Además, se identificaron regiones genómicas potencialmente asociadas a la síntesis de bacteriocinas. En conjunto, los resultados obtenidos destacan que las cepas 26 y 95 reúnen propiedades tecnológicas favorables, junto con perfiles de inocuidad y actividad bioprotectora comprobados, lo que las convierte en excelentes candidatas para su utilización como cultivos biopreservantes en la elaboración de quesos, constituyendo una alternativa efectiva para prevenir el defecto de hinchazón tardía y mejorar la calidad del producto final.

## **Agradecimientos**

Al Dr. Hugo Naya Monteverde, a la Dra. Marcela González Ramos y a la Dra. Stella Reginensi Rivera, por dirigir la tesis, su disposición y los aportes técnicos brindados a lo largo de la investigación.

A la Comisión de Posgrado de Biotecnología por apoyar el desarrollo de la tesis a través de su programa de Alícuotas de Apoyo Económico. A la Agencia ANII por la beca de Posgrado brindada.

Al tribunal evaluador, integrado por la Dra. Silvana Alborés, la Dra. Gabriela Irazoqui y la Dra. Eloísa Rochón, cuyas devoluciones contribuyeron a la calidad de los estudios presentados.

A la Dra. Tamara Fernández Calero y Dra. Luisa Berná por su guía y conocimiento aportado en los análisis bioinformáticos realizados.

A mis compañeros de la UTA quienes me apoyaron en distintas etapas del proyecto Giovanni Galieta, Jimena Viejo, Mariana Viera, Carolina González, Valeria González, Manuela Bianchi y Elvis Lorenzo.

A Julia Rodi y Héctor Olivera, mis padres, por su acompañamiento y contención.

# Índice

<b>Introducción y antecedentes.....</b>	<b>1</b>
1. Generalidades de la industria láctea nacional e importancia de la producción de quesos.....	1
2. Defectos en quesos.....	2
2.1 Defectos de origen fisicoquímico.....	2
2.2 Defectos de origen microbiológico.....	3
2.3 Hinchazón tardía .....	6
2.3.1 Relevancia del defecto de hinchazón tardía.....	7
2.3.2 Métodos de prevención de la hinchazón tardía.....	9
3. Bacterias ácido lácticas, generalidades y aplicaciones en alimentos.....	12
3.1 Bacterias ácido lacticas con actividad anticlostridial.....	14
4. Antecedentes del trabajo de tesis.....	18
5. Objetivo general y específicos.....	19
6. Organización de la tesis.....	20
7. Bibliografía .....	21

## **Capítulo I. Estudio de las condiciones de producción de compuestos anticlostridiales en extractos concentrados y evaluación de su estabilidad .....**

**43**

1. Introducción.....	43
2. Materiales y métodos.....	46
2.1 Ajuste de las condiciones de cultivo para incrementar la producción de compuestos anticlostridiales en extractos concentrados.....	46
2.2 Obtención y purificación de extractos concentrados.....	47
2.3 Preparación de suspensiones de esporas bacterianas.....	47
2.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de extractos concentrados de las cepas 26 y 95 de <i>Lacticaseibacillus</i> .....	48
2.5 Determinación del efecto antimicrobiano de los extractos concentrados (bacteriostático o bactericida).....	48
2.6 Efecto del pH y la temperatura de refrigeración en la estabilidad de extractos concentrados.....	49
3. Resultados y discusión.....	49
3.1 Ajuste de las condiciones de cultivo para incrementar la producción de compuestos anticlostridiales en extractos concentrados.....	49



3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de extractos concentrados de las cepas 26 y 95 de <i>Lacticaseibacillus</i> .....	58
3.3 Determinación del efecto antimicrobiano de los extractos concentrados (bacteriostático o bactericida).....	59
3.4 Efecto del pH y la temperatura de refrigeración en la estabilidad de extractos concentrados.....	60
4. Conclusión .....	63
5. Bibliografía .....	64

## **Capítulo 2. Caracterización tecnológica de las cepas 26 y 95 de *Lacticaseibacillus* .....**

1. Introducción.....	75
2. Materiales y métodos.....	78
2.1 Compatibilidad de cepas BAL anticlostridiales con cepas BAL empleadas en fermentos comerciales.....	78
2.2 Evaluación de la tolerancia de las cepas anticlostridiales al NaCl.....	78
2.3 Evaluación de la producción de gas por fermentación de carbohidratos....	79
2.4 Estudio de las cinéticas de crecimiento de las cepas 26 y 95 de <i>Lacticaseibacillus</i> en leche.....	79
3. Resultados y discusión.....	79
3.1 Compatibilidad de cepas BAL anticlostridiales con cepas BAL empleadas en fermentos .....	79
3.2 Evaluación de la tolerancia de las cepas anticlostridiales al NaCl.....	84
3.3 Evaluación de la producción de gas por fermentación de carbohidratos....	85
3.4 Estudio de las cinéticas de crecimiento de las cepas 26 y 95 de <i>Lacticaseibacillus</i> en leche.....	87
4. Conclusión .....	88
5. Bibliografía .....	89

## **Capítulo III. Evaluación de la actividad anticlostridial de las cepas 26 y 95 en queso tipo Dambo.....**

1. Introducción.....	99
2. Materiales y métodos.....	101
2.1 Selección de cepas de <i>C. tyrobutyricum</i> causantes de hinchazón tardía en queso tipo Dambo.....	101
2.2 Elaboración de queso tipo Dambo a escala de laboratorio.....	102
2.3 Estudio de la actividad anticlostridial de las cepas 26 y 95 en queso tipo Dambo.....	102

3. Resultados y discusión.....	104
3.1 Selección de cepas de <i>C. tyrobutyricum</i> causantes de hinchazón tardía en queso tipo Dambo.....	104
3.2 Estudio de la actividad anticlostridial de las cepas 26 y 95 en queso tipo Dambo .....	106
4. Conclusión .....	112
5. Bibliografía .....	113
 <b>Capítulo IV. Identificación y análisis genómico de las cepas 26 y 95.....</b>	<b>118</b>
1. Introducción.....	118
2. Materiales y métodos.....	119
2.1 Extracción de ADN genómico.....	119
2.2 Secuenciación de los genomas bacterianos y análisis bioinformático.....	120
3. Resultados y discusión.....	120
3.1 Secuenciación de los genomas bacterianos y análisis bioinformático.....	120
4. Conclusión .....	127
5. Bibliografía .....	129
 <b>Conclusión general.....</b>	<b>138</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>141</b>
Anexo I .....	141
1. Ajuste de las condiciones de cultivo para incrementar la producción de compuestos anticlostridiales en extractos concentrados.....	141
2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de extractos concentrados de las cepas 26 y 95 de <i>Lacticaseibacillus</i> .....	145
3. Efecto del pH y la temperatura de refrigeración en la estabilidad de extractos concentrados .....	147
Anexo II.....	148
1. Compatibilidad de cepas BAL anticlostridiales con cepas BAL empleadas en fermentos.....	148
Anexo III .....	154
1. Estudio de la actividad anticlostridial de las cepas 26 y 95 en queso tipo Dambo .....	154
Anexo IV.....	155
1. Secuenciación de los genomas bacterianos y análisis bioinformático.....	155

## **Introducción y antecedentes**

### **1. Generalidades de la industria láctea nacional e importancia de la producción de quesos**

En Uruguay la producción lechera abarca aproximadamente el 5 % del territorio. Ésta se concentra principalmente en los departamentos de Colonia, San José, Canelones y Florida, región genéricamente denominada cuenca lechera del sur, y los departamentos de Soriano, Río Negro, Paysandú, Salto y Artigas que integran la llamada cuenca lechera del litoral (Instituto Nacional de la Leche [INALE], 2011; Rosa y Arbeletche, 2016). Actualmente hay aproximadamente 3000 productores lecheros, de los cuales el 74 % remite su producción a la industria, 2114 millones de litros de leche, que corresponden al 90 % del volumen total. El resto de los productores destina su producción a la elaboración de quesos artesanales, principalmente Colonia, Dambo y Sbrinz que se consumen en el mercado interno, representando el 50 % del consumo total (Sténeri, 2003; González Cocaro et al., 2017; INALE, s.f.; Wenzel, 2025).

La industria destina el 67 % de la leche recibida a la producción de polvos lácteos, 26 % a la elaboración de quesos, 4 % a la manufactura de leche pasteurizada y leche UHT, mientras que el 2 % se emplea en la producción de yogur, el 1 % restante comprende diversos productos lácteos elaborados en menor cantidad (Dirección Nacional de Estadísticas Agropecuarias [DIEA], 2024, INALE, 2025). Cabe mencionar que el 70 % de la producción es exportado y sólo el 30 % se comercializa en el mercado interno (INALE, s.f.).

Los productos lácteos ocupan el cuarto puesto en cuanto a ganancias económicas anuales del país por exportaciones de bienes, mientras que la celulosa se encuentra en primer lugar, la carne bovina en el segundo puesto y la soja en la tercera posición del ranking. El monto facturado por este sector lechero en el año 2024 fue USD 854 millones de dólares (Uruguay XXI, 2024; INALE, 2025). Los productos lácteos nacionales más vendidos en los mercados internacionales son la leche en polvo y los quesos, correspondiendo respectivamente al 76 % y 13 % de las ganancias totales (Uruguay XXI, 2024; DIEA, 2024). A nivel mundial, Uruguay ocupa el 33.er puesto del ranking por facturación en exportaciones de quesos y el segundo de Latinoamérica, después de Argentina (Observatory of Economic Complexity, OEC, 2023). De acuerdo al porcentaje de facturación, los principales países compradores de quesos de producción nacional, son Brasil (34%), México (17 %), Chile (12 %), Paraguay (6 %) y Rusia (6%) (INALE, 2025).

Las variedades queseras semiduras y duras representan el 51 % del volumen total exportado por nuestro país. Algunos de los principales quesos de pasta dura comercializados en otros mercados, presentan características similares al Sbrinz, Parmesano y el Grana. Con respecto a los quesos de textura semidura, se destacan las variedades semejantes al Gouda, Emmental, Gruyere y Dambo. En cuanto a las variedades de pasta blanda, los más importantes son los tipos Mozzarella y Feta (Cantisani Fuentes et al., 2021; González Cocaro et al., 2017; Carro, 2024; Wenzel, 2025).

En la última década, las ganancias y los volúmenes de quesos exportados por nuestro país han sufrido una caída progresiva, en parte debido a la reducción en el precio internacional de esta variedad de productos y la retracción de la demanda de algunos de los principales países compradores, por ejemplo Rusia. La tendencia observada es parte de un estancamiento desde el año 2021 en la demanda global por parte de los principales países compradores de lácteos (INALE, 2025; van Heerden, 2023). Asimismo, las medidas económicas proteccionistas implementadas por la Unión Europea, China y Estados Unidos, han dificultado el acceso a dichos mercados. Por otra parte, ciertos países como Australia y Nueva Zelanda, tienen tratados comerciales con algunos de los principales países consumidores de productos lácteos, entre ellos China, resultando difícil vender los productos nacionales a precios competitivos (Terra, 2018; Uruguay XXI, 2021).

En referencia a la exportación de quesos a países latinoamericanos como Brasil y Argentina, en algunos períodos se han consolidado como los principales compradores de estos productos. Sin embargo, han atravesado épocas de inestabilidad económica que los han llevado a reducir sus importaciones (Terra, 2018; Uruguay XXI, 2020). También debe tenerse en cuenta que Uruguay debe competir con países como España, Italia, Francia y Suiza que son considerados referentes a nivel mundial por ciertas variedades de quesos con denominación de origen protegida, también conocida como designación PDO por la sigla en inglés (van Heerden, 2023; Tintrop et al., 2025). Todo lo anterior hace necesario que Uruguay busque diversificar los mercados a los cuales destina sus productos, estableciendo acuerdos económicos con países y bloques regionales. Asimismo, resulta esencial mantener la calidad de los quesos producidos, destacar el valor agregado del bienestar animal y el cuidado del medio ambiente a lo largo de toda la cadena láctea, así como elaborar variedades queseras con características diferenciadas que puedan ser reconocidos como productos con estatus PDO (Uruguay XXI, 2021; Falih et al., 2024; INALE, 2025; Wenzel, 2025).

## **2. Defectos en quesos**

### **2.1. Defectos de origen fisicoquímico**

Uno de los problemas que debe enfrentar la industria quesera es la aparición de defectos que reducen la calidad del producto elaborado y por lo tanto su valor económico. En casos graves, la reputación de las empresas puede verse afectada, disminuye la demanda de productos en el mercado interno y se pierden mercados compradores en el exterior. El deterioro de los quesos se debe a alteraciones fisicoquímicas o microbiológicas (Ellner, 2016; Reinheimer, 2022; Bettera et al., 2023). La modificación de los parámetros fisicoquímicos del queso y/o del ambiente al que está expuesto, puede conducir a defectos en cualquier etapa de la elaboración si se realiza fuera de los rangos correspondientes para el tipo de queso producido. Por ejemplo, durante la etapa de prensado del queso, si la presión es insuficiente, pueden aparecer ojos mecánicos en la horma por falta de compactación de los granos de cuajada. En cambio, una presión excesiva conduce a una dureza mayor a la necesaria (Domenech y Venturino, 2011; Saito, 2014; Crespo et al., 2020; Ong et al., 2022). Otro ejemplo es el

salada del queso, si el tiempo de permanencia en la salmuera no es suficiente, el queso carece de sabor y la textura es más blanda porque retiene más humedad. Sin embargo, si el tiempo de permanencia excede lo necesario, se obtiene un sabor demasiado salado y la textura resultante es muy dura debido a la pérdida de humedad (Domenech y Venturino, 2011; Giroux et al., 2022). El monitoreo adecuado de los parámetros fisicoquímicos a lo largo del proceso de manufactura suele evitar esta clase de defectos.

## 2.2. Defectos de origen microbiológico

Con respecto a los defectos queseros de origen microbiológico, suelen producirse cuando en el proceso de manufactura no se logra prevenir la contaminación del producto con microorganismos causantes de deterioro, y no es posible su eliminación o la inhibición de su crecimiento por los métodos de control empleados.

Uno de los defectos frecuentes es la hinchazón temprana. Esta alteración puede aparecer durante el moldeo, salado o en los dos primeros días de maduración del queso. Se caracteriza por la presencia de numerosos ojos pequeños en la masa del queso, producto de la acumulación de CO<sub>2</sub>, que le confieren apariencia esponjosa. Este gas es generado por fermentación de la lactosa remanente en la cuajada, proceso que en la mayoría de los casos es realizado por bacterias coliformes, aunque también puede deberse a levaduras contaminantes (Tabla et al., 2018; Lampien, 2023; Moawad y Khalil, 2021; Velasco et al., 2025). Entre las bacterias coliformes comúnmente asociadas con este defecto se encuentran *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter braakii*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* y *Hafnia alvei* (Tabla et al., 2018; Martin et al., 2021; Pasquali et al., 2022). La pasteurización de la leche permite eliminar a este grupo bacteriano y por lo tanto evita la ocurrencia de hinchazón temprana por estos microorganismos. Sin embargo, si el proceso de pasteurización no se realiza correctamente, los coliformes permanecen viables y pueden causar la alteración. Por otro lado, si las condiciones higiénicas del proceso de elaboración quesera son deficientes, la recontaminación microbiana es factible (Moawad y Khalil, 2021; Tabla et al., 2022; Velasco et al., 2025). Es importante mencionar que el crecimiento de bacterias coliformes en la cuajada tiene lugar, cuando la velocidad de crecimiento del cultivo iniciador que fermenta la lactosa, es menor a la esperada, en consecuencia, el desarrollo de acidez ocurre más lentamente y queda lactosa residual que es fermentada por las bacterias coliformes (Tabla et al., 2022; Lampien, 2023; Velasco et al., 2025).

En referencia a la hinchazón temprana causada por levaduras, para su ocurrencia la carga microbiana debe ser superior a 10<sup>4</sup> - 10<sup>6</sup> UFC/g (Geronikou et al., 2020; Makki et al., 2020; Bintsis, 2021). Las especies de levaduras usualmente asociadas con la aparición del defecto son *Kluyveromyces lactis*, *Torulaspora delbrueckii*, *Debaryomyces hansenii*, *Dekkera anomala*, *Candida sphaerica*, *Yarrowia lipolytica*, *Torulaspora blattae* y *Lachancea thermotolerans* (Geronikou et al., 2020; Makki et al., 2020; Bintsis, 2021). La incidencia de la hinchazón temprana causada por levaduras es mayor cuando se emplean fermentos queseros compuestos únicamente por cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) galactosa-negativas, en estas condiciones, la galactosa no

metabolizada por las cepas BAL es fermentada por levaduras galactosa-positivas, produciéndose más cantidad de CO<sub>2</sub> (Geronikou et al., 2020; Zheng et al., 2021).

El crecimiento de levaduras en los quesos también puede provocar otras alteraciones como ablandamiento y sabor amargo por proteólisis de las caseínas; sabores desagradables, a rancio, agrio, jabonoso o frutal por producción de ácidos grasos de cadena media y corta mediante lipólisis; y compuestos volátiles como alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres por degradación de ácidos grasos y aminoácidos (Makki et al., 2020; Zheng et al., 2021). Otro defecto provocado es la aparición de manchas de color marrón, rosada o roja en la corteza del queso, principalmente por crecimiento de *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula* spp., *Candida* spp. y *Debaryomyces* spp. (Geronikou et al., 2020; Lampien, 2023; Di Renzo et al., 2023). Además, la proliferación de levaduras en los quesos provoca un aumento del pH por la liberación de NH<sub>3</sub> y catabolismo del lactato, facilitando el crecimiento de otros microorganismos contaminantes, los cuales son sensibles a las condiciones ácidas del queso (Bintsis, 2021; Zheng et al., 2021).

Los hongos filamentosos también pueden causar alteraciones en quesos que requieren períodos largos de maduración. Estos microorganismos pueden provenir del aire de la cámara de maduración, la salmuera, ingredientes adicionados en ciertas variedades queseras y los equipos empleados en el proceso de manufactura (Garnier et al., 2017; Martin et al., 2021). El crecimiento fúngico deteriora la corteza del queso por detección visual del micelio, producción de pigmentos y generación de malos aromas y sabores. La textura del queso también puede ser afectada por la intensa actividad proteolítica y lipolítica de los hongos (Garnier et al., 2017; Martin et al., 2021; Prado Martin y Cotter, 2023). Los géneros contaminantes más frecuentes son *Penicillium* y *Aspergillus*. Otros géneros alterantes son *Mucor*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Aureobasidium*, *Gliocladium*, *Eurotium*, *Epicoccum*, *Acremonium*, *Lecanicillium*, *Exophiala* y *Wallemia* (Makki et al., 2020; Martin et al., 2021; Prado Martin y Cotter, 2023). Además de los defectos sensoriales, algunas especies de hongos pueden producir metabolitos secundarios denominados micotoxinas, que son perjudiciales para la salud del consumidor. En los quesos las micotoxinas que suelen ser detectadas son Ocratoxina A (OTA), Esterigmatocistina (STC), las Aflatoxinas AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub>; Citrinina (CIT), Penitrem A, Ácido Ciclopiazónico (CPA), Ácido Micofenólico (MPA) y Roquefortina-C (ROQ-C) (Hymery et al., 2014; Dobson, 2017; Garnier et al., 2017; Prado Martin y Cotter, 2023).

Algunas de las medidas más adecuadas para prevenir el desarrollo de hongos y levaduras en los quesos consisten en filtrar y pasteurizar la salmuera en forma frecuente, en la cámara de maduración se debe controlar que la temperatura y la humedad relativa se mantengan en los rangos óptimos y que el flujo de aire sea suficiente para evitar condensación de agua en la corteza del queso. La aplicación de ozono en la cámara de maduración, así como el tratamiento de los quesos con sorbatos, benzoatos o natamicina son medidas que también contribuyen a reducir la presencia de estos microorganismos (Tabla y Roa, 2022; Silva et al., 2023; Aranda et al., 2025).

El defecto de hinchazón tardía es una alteración que ocurre en quesos duros y semiduros, a partir de las cuatro a seis semanas de maduración, aunque suele detectarse entre el segundo y tercer mes de maduración (Esteban et al., 2020; Martin et al., 2021; Bettera et al., 2023). El defecto se caracteriza por la presencia de ojos irregulares, rajaduras o cavernas en la masa del queso que son causados por la proliferación de especies de *Clostridium* contaminantes. En la fermentación ácido butírica producida por estas bacterias se generan gases, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>, cuya acumulación origina dichas aberturas. También pueden percibirse malos aromas y sabores por la producción de ácido butírico y acético (Bettera et al., 2023; Sánchez et al., 2024; Velasco et al., 2025). En el apartado 2.3 de esta sección se aborda con mayor detalle este defecto, así como las estrategias aplicadas en la producción quesera para controlar el crecimiento de *Clostridium* y reducir la ocurrencia de hinchazón tardía.

Las bacterias psicrótrofas como *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Chryseobacterium*, *Serratia* y *Achromobacter*, forman parte de la microflora de la leche cruda y pueden ser eliminados por pasteurización, pero producen proteasas y lipasas que son termoestables, por lo que mantienen su actividad enzimática, generando péptidos amargos y ácidos grasos de sabor rancio que pueden transferirse al queso elaborado. Incluso, algunas de estas enzimas pueden permanecer activas en la etapa de maduración quesera, alterando el perfil proteolítico y lipolítico del producto final. Además, algunas especies de estos géneros producen pigmentos que alteran la coloración del queso (Yuan et al., 2018; Yeluri Jonnala et al., 2021; Reinheimer, 2022; Ritschard y Schuppler, 2024). La estrategia más adecuada para disminuir la aparición de estas alteraciones, consiste en implementar correctas prácticas de manejo en el tambo, con el fin de minimizar la contaminación de la leche cruda con estos microorganismos a partir de los ambientes en que se encuentran (agua, suelo y pasturas) (Yuan et al., 2018; Reinheimer, 2022; Ritschard y Schuppler, 2024).

El desarrollo de bacterias ácido lácticas (BAL) generalmente contribuye a la producción de los quesos aportando características deseadas de sabor, aroma y textura. Sin embargo, se han reportado defectos atribuidos al crecimiento de ciertas cepas de BAL. Una de estas alteraciones es la presencia de pigmentación rosada, roja o marrón en la corteza de los quesos provocada por cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* y *Leuconostoc* al metabolizar tirosina. Este defecto también se ha atribuido al empleo de cepas de *Streptococcus thermophilus*, las cuales producen galactosa como subproducto de la fermentación de la lactosa, este carbohidrato establece reacciones de Maillard con péptidos y aminoácidos generando compuestos de coloración (Peralta et al., 2018; Yeluri Jonnala et al., 2021; Lampien, 2023).

Otro defecto frecuente en la superficie de los quesos es la presencia de cristales de lactato de calcio, los cuales son producidos principalmente por cepas de bacterias ácido lácticas no iniciadoras (non-starter lactic acid bacteria -NSLAB-) durante la etapa de maduración quesera. Dichas cepas racemizan el ácido L(+)-láctico producido en la fermentación ácido láctica, en ácido D(-)-láctico que es menos soluble y tiende a precipitar más cuando reacciona con el calcio,

originando los cristales mencionados (Johnson, 2014; Reginensi et al., 2016; Kiran-Yildirim et al., 2018).

Por otro lado, en quesos afectados por hinchazón temprana, así como otros con hinchazón tardía, la producción de CO<sub>2</sub> se ha atribuido a cepas de *Leuconostoc*, *Lactococcus* citrato-positivas y *Lactobacillus* heterofermentativos, aunque hay investigaciones que adjudican la generación de gas al crecimiento de bacterias ácido propiónicas y cepas de *Bacillus* con la aparición de estos defectos (Reinheimer, 2022; Ritschard y Schuppler, 2024).

### 2.3. Hinchazón tardía

El defecto de hinchazón tardía es la principal causa de deterioro en quesos duros y semiduros que reduce su calidad y valor comercial. Los quesos afectados se caracterizan por la presencia de ojos irregulares, rajaduras, cavernas e incluso abombamiento de la horma de queso. También es frecuente la generación de aromas y sabores desagradables. La hinchazón tardía generalmente ocurre a partir de las cuatro a seis semanas de maduración de los quesos. Sin embargo, las señales de deterioro suelen detectarse entre los dos a tres meses de maduración (Gómez-Torres et al., 2019; Esteban et al., 2020; Cecere et al., 2021; Sánchez et al., 2024; Velasco et al., 2025). Esta alteración es producida por especies de *Clostridium*, principalmente por *C. tyrobutyricum*, aunque *C. butyricum*, *C. beijerinckii* y *C. sporogenes* también son causantes frecuentes. Otras especies contaminantes pero menos reportadas son *C. pasteurianum*, *C. tertium*, *C. bifermentans* (recientemente renombrado como *Paraclostridium bifermentans*), *C. perfringens*, *C. tetanomorphum*, *C. novyi* y *C. jeddahense* (renombrado como *Faecalispora jeddahense*) (Bermúdez et al., 2016; Brändle et al., 2016; Doyle et al., 2018; Silvetti et al., 2018; Ávila et al., 2023a; Kaya et al., 2023; Klijn et al., 2025).

Las bacterias del género *Clostridium* son anaerobias, formadoras de esporas, que se encuentran en distintos ambientes del tambo tales como suelo, ensilados, heces de los animales y agua, desde los cuales logran acceder a la leche cruda durante el proceso de ordeño (Esteban et al., 2020; Cecere et al., 2021; Ertürkmen y Öner, 2023; Kaya et al., 2023). La elevada resistencia de las esporas a condiciones adversas de pH, temperatura, radiación UV, agentes desinfectantes, baja actividad de agua, entre otras, hace difícil su eliminación, pudiendo permanecer en la línea de producción durante largos períodos de tiempo y contaminar el producto final (Doyle et al., 2015; Murphy et al., 2016; Oliveira et al., 2016; Esteban et al., 2020). Sumado a lo anterior, se sabe que *Clostridium* puede producir biopelículas (biofilms), pero no hay investigaciones suficientes sobre las condiciones en que se forman y su estabilidad frente a distintos procesos de limpieza y desinfección. En consecuencia, se desconoce cuál es su relevancia en la permanencia y dispersión de *Clostridium* en el ambiente de producción quesera (Pantaléon et al., 2014; Khan, 2017; Diarra et al., 2023).

La ocurrencia de la hinchazón tardía depende de varios factores. En primer lugar, cuanto mayor es la carga de esporulados anaerobios presentes en la leche, más alta es la incidencia del defecto. Asimismo, las especies de *Clostridium* difieren



en su actividad gasificante, incluso pueden existir discrepancias entre cepas de una misma especie (Le Bourhis et al., 2007; Garde et al., 2011a; Arias, 2013; Brändle et al., 2016; Podrzaj et al., 2020). Algunos estudios determinaron que hay mayor incidencia del defecto en quesos contaminados con mezclas de cepas de *C. tyrobutyricum* con *C. beijerinckii* y/o *C. sporogenes*. Esto podría deberse a la existencia de sinergismo entre las especies mencionadas (Le Bourhis et al., 2007; Garde et al., 2011a).

Las combinaciones de temperatura y tiempo asociadas a los procesos de salado, cocción y maduración de los quesos también inciden en la aparición del defecto porque pueden potenciar la germinación de las esporas clostridiales. Las características fisicoquímicas de pH, concentración de sal, así como el contenido de lactato, grasa, aminoácidos libres y humedad del producto final también influyen en la ocurrencia de hinchazón tardía. En consecuencia, las distintas variedades queseras no presentan la misma susceptibilidad al defecto (Postollec et al., 2012; Brändle et al., 2016; Oliveira et al., 2016; Burtscher et al., 2020; Renoldi et al., 2024). Algunos investigadores consideran que los quesos más propensos son los que tienen valores de pH mayores o iguales a 5.2 - 5.6, una tasa de difusión de NaCl lenta en la etapa de salado, alta concentración de lactato disponible y se maduran a temperaturas superiores a 10 °C durante varios meses (Podrzaj et al., 2020; Qian et al., 2022; Carminati et al., 2024). Además, el desarrollo de otros microorganismos en la matriz del queso puede inhibir o estimular el crecimiento de *Clostridium*. En referencia a este último factor, hay trabajos que reportaron mayor proliferación de *Clostridium* en quesos que también presentaron predominancia de ciertas especies de BAL, entre ellas *Streptococcus thermophilus*, *Lactocaseibacillus rhamnosus* y *Lactobacillus delbrueckii* (Bassi et al., 2015; Murphy et al., 2016; Velasco et al., 2025). Debido a que la incidencia del defecto es multifactorial, no hay consenso entre los trabajos científicos que han determinado la carga de esporas clostridiales necesaria para que la alteración se produzca, existiendo valores mínimos reportados de 10 a 1000 esporas/L de leche (Stadhouders, 1990; Klijn et al., 1995; Bachmann, 1999; Borreani y Tabacco, 2008; Garde et al., 2012; Summer et al., 2014; Doyle et al., 2015; Burtscher et al., 2020, 2024).

### **2.3.1. Relevancia del defecto de hinchazón tardía**

La hinchazón tardía es la principal causa de deterioro en quesos duros y semiduros que ocurre durante su maduración que es la última etapa del proceso de elaboración y no puede ser corregido. Esto tiene un doble impacto económico para la industria láctea por los recursos financieros invertidos a lo largo de toda la línea productiva y las pérdidas económicas asociadas al descarte de los quesos severamente afectados, ventas a precios más bajos en el mercado local respecto a los precios que pueden conseguirse en mercados internacionales, así como a la elaboración de queso rallado y fundido que también producen menores ganancias comerciales (Ortakci et al., 2015; Xue et al., 2021; D'Incecco, 2017; Campfield, 2020; Díaz Muro, 2020). Además, como se explica en el apartado 1 de esta sección, el principal destino de la producción quesera nacional, en cuanto a volumen comercializado e ingresos financieros generados, son los mercados extranjeros, la presencia de defectos atenta contra la posible expansión de estas

exportaciones y reduce la demanda de los países compradores (Ojeda et al., 2014; Bettera et al., 2023; Falih et al., 2024).

Actualmente ningún país cuenta con datos que permitan estimar la incidencia real de la hinchazón tardía en toda su producción quesera, quizás porque no se han implementado mecanismos que permitan recolectar este tipo de datos productivos, o resulta difícil su implementación. Las escasas investigaciones existentes han evaluado la ocurrencia del defecto en ciertas variedades queseras. Un estudio realizado por Biango-Daniels y Wolfe, (2021) en quesos artesanales producidos en Estados Unidos, reportó pérdidas frecuentes del 1 a 5 %. En queso tipo Gouda elaborado en ese mismo país, se estimó una ocurrencia del defecto entre 9 a 36 % (Qian et al., 2022). Estudios realizados en queso Grana Padano, en Italia, determinaron tasas de deterioro entre 2 a 35 % con pérdidas económicas aproximadas de 25 - 35 millones de dólares (D’Incecco, 2017; Arnaboldi et al., 2021; Morandi et al., 2022; Guaita et al., 2024). Debe tenerse en cuenta que las características fisicoquímicas del producto y el proceso de manufactura influyen en la incidencia del defecto, por lo que resulta difícil extrapolar estos resultados a cualquier variedad elaborada.

A pesar de la amplia literatura científica referida al defecto de hinchazón tardía, así como a la búsqueda y evaluación de métodos capaces de impedir o disminuir el desarrollo de *Clostridium* en quesos, no existen estrategias de control que sean completamente efectivas. Por otro lado, la aplicación de buenas prácticas agrícolas y de ordeño en la producción primaria, sólo permiten disminuir la carga de esporas de bacterias ácido butíricas que logran contaminar la leche cruda (Ávila et al., 2017; Qian et al., 2022; Velasco et al., 2025). Una medida propuesta para disminuir la carga de esporas butíricas en la leche y ayudar a la industria a estimar el riesgo de hinchazón tardía, consiste en incluir este recuento como parámetro de los sistemas de pago por calidad de la leche. Actualmente, la mayoría de los países no ha implementado este parámetro dentro de sus sistemas de pago. Sin embargo, algunas regiones de Francia, Italia, España, Suecia, Holanda, Suiza, Finlandia y Noruega, reconocidas a nivel mundial por su producción quesera, aplican este criterio a nivel local para el pago de la leche destinada a dicha producción (Mucchetti y Zambrini, 2018; Millet y Casabianca, 2019; Dereser Puyana, 2020).

En los últimos veinte años la ocurrencia de hinchazón tardía ha aumentado su frecuencia por distintas razones. Una de ellas es la intensificación de la producción lechera, que ha llevado a aumentar el aporte de ensilados en la dieta del ganado, los cuales son una de las principales fuentes de contaminación de la leche con esporas clostridiales (Lizarralde et al., 2014; Nescier et al., 2015). Si bien Uruguay tiene una ganadería predominantemente pastoril, también ha seguido esta tendencia (Chilibroste, 2015; Bermúdez et al., 2016). Otro aspecto de la intensificación productiva, es el aumento del tamaño de los rodeos lecheros, lo que implica una mayor presencia en la sala de ordeño de barro, pastura y estiércol, así como tiempos de ordeños más largos, favoreciendo la contaminación de la leche (Bermúdez et al., 2016; Cecere et al., 2021; Chilibroste et al., 2024).

Una hipótesis que podría explicar en parte el incremento en el número de casos de hinchazón tardía es que las condiciones de producción, los métodos de control del crecimiento de *Clostridium*, así como los procesos de limpieza y desinfección aplicados en las plantas queseras, estarían ejerciendo una presión selectiva que favorece la permanencia de cepas de bacterias ácido butíricas en el ambiente de producción (Postollec et al., 2012; Brändle et al., 2016). A nivel industrial, otro aspecto importante es que el número de quesos por lote o corrida de producción es mayor que en la producción artesanal. Debido a esto, la incidencia de hinchazón tardía suele ser mayor si la leche empleada contiene alta carga de esporas de *Clostridium* (Cosentino et al., 2015; Ávila et al., 2017).

### 2.3.2. Métodos de prevención de la hinchazón tardía

Hay varias estrategias para prevenir el desarrollo de *Clostridium* en los quesos y evitar la ocurrencia del defecto. Los métodos más empleados por la industria quesera son la bactofugación, la microfiltración y el agregado de preservantes químicos (lisozima y sales de nitrato) a la leche (Ruusunen et al., 2012; Garde et al., 2018). La bactofugación permite eliminar entre el 86 al 98 % de las esporas de bacterias anaerobias presentes en la leche, aunque ese porcentaje puede llegar al 99 % si se realiza una doble bactofugación (Ruusunen et al., 2012; Brändle et al., 2016; Velasco et al., 2025). Este método no resulta adecuado para evitar la hinchazón tardía cuando la carga de esporas clostridiales es elevada (Brändle et al., 2016). Además, existe mayor dificultad para remover las esporas de *C. tyrobutyricum*, *C. beijerinckii* y *C. sporogenes* que las pertenecientes a *C. butyricum*. También implica la pérdida de componentes de la leche, principalmente proteínas, pudiendo disminuir el rendimiento quesero (Brändle et al., 2016; Velasco et al., 2025). La microfiltración de la leche es capaz de remover el 99% de las esporas presentes, pero requiere separar previamente la grasa de la leche porque los glóbulos grasos no logran atravesar las membranas utilizadas (Ruusunen et al., 2012; Garde et al., 2018; Velasco et al., 2025). Además, debe realizarse un remplazo periódico de las membranas. Por estas razones, la microfiltración resulta un proceso costoso (Hassan et al., 2021; Sánchez et al., 2024).

La adición de lisozima es una estrategia ampliamente empleada por la industria quesera para el control de *Clostridium* y otras bacterias contaminantes. La lisozima es una enzima que provoca la ruptura del enlace glicosídico  $\beta(1-4)$  entre los compuestos ácido N-acetil murámico y N-acetil glucosamina de la pared de peptidoglicano, causando el debilitamiento de la pared celular y conduce a la lisis bacteriana (Carrillo, 2013; Bermúdez et al., 2016; El-Prince et al., 2018; Akbal y Öner, 2024). Existen limitaciones en la efectividad de la lisozima, como la existencia de recuentos de esporas clostridiales superiores a 300 esporas/L de leche, la resistencia de las esporas de algunas cepas de *Clostridium* y la susceptibilidad de los cultivos iniciadores (Lodi, 1990; Stadhouders y van den Berg, 2012; Brändle et al., 2016; Licon et al., 2020; Morandi et al., 2021). Por otra parte, según Bassi et al. (2009), si se emplean concentraciones excesivas de lisozima, la germinación de esporas de *C. tyrobutyricum* puede potenciarse. Además, la lisozima más comercializada proviene de la clara de huevo que es uno de los ocho alimentos responsables del 90% de las alergias (Mainente et al., 2017; Mora et al., 2018; Peruzy et al., 2022; Şahiner et al., 2023).

Las sales de nitrato son preservantes químicos baratos y muy efectivos para inhibir el crecimiento de *Clostridium* en los quesos (Brändle et al., 2016; Şahiner et al., 2023). Los nitratos son reducidos por bacterias nitrato-reductoras presentes en el queso, entre ellas coliformes, *Lactobacillus* y microflora de la corteza, así como por la enzima xantina oxidasa de la leche, generándose nitritos que impiden la germinación de las esporas clostridiales (Brändle et al., 2016; Velasco et al., 2025). A pesar de las ventajas mencionadas, este método de control está prohibido en varios países porque los nitratos pueden reaccionar con aminoácidos aromáticos del queso produciendo nitrosaminas que son compuestos cancerígenos (Garde et al., 2011a, 2018; Şahiner et al., 2023). Cabe indicar que algunas investigaciones sugieren que la producción de nitrosaminas ocurre a valores de pH inferiores a los existentes en quesos duros y semiduros, por lo cual, habrían niveles bajos o no detectables de estos compuestos (Garde et al., 2018; Velasco et al., 2025). Otra limitante es que los nitritos generados pueden inhibir a las bacterias ácido propiónicas que son empleadas en la elaboración de quesos tipo Suizo (Brändle et al., 2016; Şahiner et al., 2023; Velasco et al., 2025).

Debido a las desventajas de los métodos tradicionalmente empleados por la industria para disminuir la ocurrencia de hinchazón tardía, se han planteado varias estrategias alternativas, algunas de ellas consisten en descremar la leche, aumentar la concentración de sal en el queso, incorporar sal directamente a la cuajada, emplear tinas queseras de cobre, adicionar extractos de plantas aromáticas en la cuajada, pre-madurar los quesos a temperaturas inferiores a 10 °C y someter los quesos a tratamientos de altas presiones (Brändle et al., 2016; Hassan et al., 2021; Ávila et al., 2023a; Velasco et al., 2025). Sin embargo, estas formas de control tampoco son completamente efectivas. Además algunas de ellas pueden modificar las características del producto final. Sumado a lo discutido previamente, debe agregarse la creciente demanda de los consumidores por productos alimentarios sin agregado de aditivos químicos o con menor incorporación de éstos, lo que implicaría dejar de aplicar preservantes alimentarios. Asimismo, en la elaboración de algunas variedades de quesos con designación de origen protegida (Protected Designation of Origin -PDO-) se prohíbe la aplicación de preservantes químicos y tratamientos físicos a la leche (González y Zárate, 2015; Brändle et al., 2016; Ávila et al., 2020a). Debido a todo lo anterior, es necesaria la colaboración entre la comunidad académica y el sector industrial para el desarrollo de estrategias de control alternativas compatibles con la industria quesera.

Una forma propuesta para prevenir el crecimiento de *Clostridium* en los quesos se basa en el biocontrol o biopreservación del alimento, esto es adicionar en el alimento microorganismos con actividad antimicrobiana o sus compuestos bioactivos para inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos y/o alternantes (Hassan et al., 2021; Zapašnik et al., 2022; Şahiner et al., 2023). Una estrategia de biocontrol consiste en aplicar en la leche destinada a la producción quesera, bacteriófagos contra las principales especies de *Clostridium* causantes del defecto. Este método tiene bajo costo, no afecta las características sensoriales del alimento y se considera seguro para el ser humano debido a la alta especificidad del bacteriófago por su hospedador. Sin embargo, pocas

investigaciones han evaluado la efectividad de bacteriófagos contra bacterias esporogénicas (Shi y Maktabdar, 2022; Ávila et al., 2023b). Otra forma de biocontrol es el uso de cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) con actividad anticlostridial como cultivos bioprotectores compatibles con el proceso de producción quesera y las propiedades organolépticas del queso producido (Shi y Maktabdar, 2022; Şahiner et al., 2023). Una opción similar es la aplicación en la leche de sus compuestos anticlostridiales purificados (Hassan et al., 2021; Putri et al., 2024).

La acción biopreservante de las cepas BAL se debe a la producción de variados compuestos antimicrobianos, entre estos se encuentran ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, acetaldehído, diacetilo, acetoína, ácidos grasos, etanol, dióxido de carbono, exopolisacáridos, D-aminoácidos, compuestos fenólicos, reuteriicina, reuterina y bacteriocinas (Ajao et al., 2018; Özogul y Hamed, 2018; García-Cano et al., 2019; Putri et al., 2024; Muharram et al., 2025). En la actualidad, la industria alimentaria así como el sector académico muestran gran interés en disponer de cepas BAL bioprotectoras que sean seguras para el ser humano y compatibles con los procesos de elaboración y las características fisicoquímicas del producto final (Shi y Maktabdar, 2022; Rossi, 2023; Rama et al., 2024). Asimismo, pensando en eventuales aplicaciones en los alimentos, varios trabajos científicos purifican y caracterizan los compuestos antimicrobianos responsables del biocontrol ejercido por las cepas BAL (Shi y Maktabdar, 2022; Zhang et al., 2022). Es importante destacar que la biopreservación de los alimentos permitiría satisfacer la creciente demanda de los consumidores por productos alimentarios libres de aditivos químicos o con menor agregado de éstos (Shi y Maktabdar, 2022; Zapašnik et al., 2022; Putri et al., 2024).

Gran parte de la literatura científica que ha estudiado el potencial de cepas BAL como biopreservantes, se ha enfocado en la producción y caracterización de bacteriocinas, compuestos antimicrobianos de naturaleza peptídica que pueden tener efecto bacteriostático o bactericida sobre microorganismos filogenéticamente cercanos al microorganismo productor (Negash y Tsehai, 2020; Wang et al., 2021). Estos metabolitos no alteran las características sensoriales de los alimentos porque carecen de color, aroma y sabor, además al ser degradados por proteasas digestivas, son consideradas seguras para el ser humano y su microflora intestinal (Soltani et al., 2022; Wang et al., 2024). Otras ventajas que supone el uso de las bacteriocinas como biopreservantes en los alimentos son su efectividad a bajas concentraciones en el orden de ng/mL o incluso pg/mL, su estabilidad a pH extremos, alta concentración de sal y tratamientos térmicos, así como su compatibilidad con otros métodos de control microbiano (Negash y Tsehai, 2020; Soltani et al., 2022). También hay interés en el uso clínico de las bacteriocinas, debido a que los tratamientos con antibióticos han llevado al surgimiento de cepas bacterianas multiresistentes. Las bacteriocinas son más efectivas que los antibióticos y la adquisición de resistencia es menor (Negash y Tsehai, 2020; Ren et al., 2022; Tang et al., 2022; Wang et al., 2023).

Las bacteriocinas pueden ser aplicadas en los alimentos de manera *in situ* o *ex situ*. La estrategia *in situ* consiste en inocular el alimento con la cepa

bacteriocinogénica para que ésta produzca el compuesto en la matriz del producto. En cambio, la estrategia *ex situ* se basa en aplicar en el alimento la bacteriocina purificada o semi-purificada a partir de un cultivo de la cepa productora o adicionar como ingrediente un fermentado preparado con dicha cepa. Cabe aclarar que la única bacteriocina aprobada para su uso como aditivo químico en alimentos es la Nisina. La presencia de otras bacteriocinas en los productos alimentarios requiere su producción *in situ* a partir de las cepas bacteriocinogénicas (Castro et al., 2017; Strack et al., 2020; Singh et al., 2025).

La efectividad de cepas BAL productoras de bacteriocinas como agentes bioprotectores en los quesos depende de una serie de factores que deben ser evaluados, estos son las características fisicoquímicas de la variedad quesera elaborada y su proceso de manufactura, porque afectan la capacidad de crecimiento de dichas cepas, así como la biosíntesis y la actividad de sus metabolitos inhibitorios. Otro factor a considerar es la interacción de las cepas biopreservantes con los cultivos iniciadores empleados, pudiendo ocurrir inhibición o estimulación del crecimiento de uno o ambos tipos de microorganismos (Castro et al., 2017; Havlíková et al., 2018; Bintsis y Papademas, 2024). Además de los aspectos que influyen en el crecimiento de las cepas bacteriocinogénicas, también debe tenerse en cuenta las variables que pueden afectar la estabilidad de las bacteriocinas producidas, entre ellas las condiciones fisicoquímicas del proceso de elaboración, la composición del queso, los aditivos químicos incorporados, presencia de proteasas microbianas y la interacción de estos compuestos con lípidos o proteínas del queso. La difusión de las bacteriocinas en la pasta del queso es otro aspecto que condiciona la efectividad de esta estrategia de control (Castro et al., 2017; Havlíková et al., 2018; Todorov, 2019; Bintsis y Papademas, 2024).

### **3. Bacterias ácido lácticas, generalidades y aplicaciones en alimentos**

Las bacterias ácido lácticas son bacterias Gram-positivas productoras de ácido láctico mediante fermentación de carbohidratos, son anaerobias aerotolerantes o microaerófilas, no esporoformadoras, ácido-tolerantes, no móviles, catalasa-negativas, con morfología celular de bastón o coco. Estos microorganismos forman parte de la microflora natural de la leche, frutas, hortalizas, carnes, tracto gastrointestinal y otras mucosas de humanos y animales (Bintsis, 2018; Zhang et al., 2023; Putri et al., 2024). En la actualidad se reconocen 40 géneros de BAL organizados en seis familias: *Lactobacillaceae*, *Streptococcaceae*, *Leuconostocaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae* y *Aerococcaceae*. En leche y productos lácteos, los géneros bacterianos más frecuentes y de mayor importancia tecnológica son *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Lactocaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Levilactobacillus*, *Limosilactobacillus* y *Enterococcus* (Bintsis, 2018; Psomas et al., 2023; Rossi, 2023; Martini et al., 2024; Putri et al., 2024).

La mayoría de las cepas BAL tienen status GRAS (*Generally Recognized As Safe*) y son de interés para la industria alimentaria, así como por la comunidad científica por sus posibles usos biotecnológicos. De acuerdo a su funcionalidad las cepas BAL pueden ser empleadas para: 1) producir alimentos fermentados con características adecuadas de sabor, aroma y textura; 2) preservar los

alimentos por producción de compuestos antimicrobianos que inhiben el desarrollo de microorganismos contaminantes alterantes y patógenos; 3) incorporarlas en alimentos para su consumo debido al efecto positivo que ejercen algunas de estas cepas en la salud humana (García-Díez y Saraiva, 2021; Ağagündüz et al., 2022; Bintsis y Papademas, 2024). La industria alimentaria emplea cultivos liofilizados comerciales, denominados cultivos iniciadores, compuestos por una o más cepas BAL para que desarrollen en los productos elaborados una o más de las funciones antes mencionadas (García-Díez y Saraiva, 2021; Bintsis y Papademas, 2024).

Los cultivos iniciadores utilizados en la elaboración de productos lácteos fermentados suelen ser diferenciados en cultivos iniciadores primarios o secundarios. Los cultivos iniciadores primarios o cultivos *starters* son cepas BAL denominadas SLAB (*Starter Lactic Acid Bacteria*), que producen ácido láctico como producto principal de la fermentación de carbohidratos y se adicionan a la leche para provocar la reducción del pH y contribuir a la coagulación de las proteínas caseínas de la leche, si bien también pueden realizar otras funciones. Todos los productos lácteos fermentados requieren el desarrollo de estas cepas (Blaya et al., 2018; Ordonho Carneiro et al., 2024). Los cultivos iniciadores secundarios o cultivos adjuntos son adicionados a la leche con una finalidad distinta al desarrollo de la acidez, que puede ser aportar otras características sensoriales al producto, biopreservar el alimento elaborado o conferir un efecto probiótico (Garbowska et al., 2021; Randazzo et al., 2021; Ordonho Carneiro et al., 2024). A diferencia de los cultivos iniciadores primarios, los cultivos adjuntos sólo son adicionados cuando las propiedades que otorgan son esenciales para el tipo de producto elaborado. Los cultivos iniciadores secundarios pueden estar compuestos por cepas BAL denominadas NSLAB (*Non-Starter Lactic Acid Bacteria*), así como otros grupos bacterianos, entre ellos *Propionibacterium*, *Bifidobacterium* y *Brevibacterium*, ciertos géneros de hongos como *Penicillium* y *Geotrichum* y levaduras, entre ellas *Kluyveromyces* y *Dabaryomyces* (Irlinger et al., 2017; García-Díez y Saraiva, 2021; Nikoloudaki, 2021). Cabe indicar que las cepas NSLAB tienen menor poder acidificante que las cepas SLAB porque la fermentación que llevan a cabo genera una mezcla equimolar de ácido láctico, ácido acético, etanol y CO<sub>2</sub> (Bintsis, 2018).

En la producción de quesos, una diferencia adicional entre los cultivos iniciadores primarios y secundarios es la etapa en que predominan (Reginensi et al., 2016; Barzideh et al., 2022). Los cultivos iniciadores primarios proliferan en las primeras horas a días de haber sido elaborado el queso. Sin embargo, a lo largo de las etapas de prensado, salado y maduración, la matriz del queso se vuelve un ambiente hostil para el desarrollo de las cepas SLAB por el bajo pH desarrollado, la ausencia de carbohidratos fermentables, alto contenido de NaCl y reducción de la actividad de agua, lo que conduce a la muerte de esta población bacteriana por autólisis, liberando sus enzimas que siguen actuando en el queso (Reginensi et al., 2016; Lazzi et al., 2016; Margalho et al., 2021; Bettera et al., 2023). En cambio, las cepas NSLAB y otros microorganismos empleados como cultivos adjuntos están adaptados a estas condiciones fisicoquímicas por lo que comienzan a proliferar en las primeras semanas de maduración hasta convertirse en la microflora dominante en la etapa de maduración (Lazzi et al., 2016; Peralta et al., 2017; Margalho et al., 2021; Bettera et al., 2023).

En la elaboración de productos lácteos fermentados de manera netamente artesanal no se emplean cultivos iniciadores comerciales, en su lugar se promueve el desarrollo de las cepas BAL autóctonas de la leche cruda o las que se encuentran en un producto o subproducto lácteo previamente elaborado, que es empleado como inoculante en una nueva elaboración, por ejemplo, el suero quesero. Los productos obtenidos tienen características sensoriales distintivas debido a la diversidad de microorganismos que las aportan (Bemfeito et al., 2016; Bintsis et al., 2024). A nivel industrial existe una limitada oferta de cepas BAL comerciales y gran parte de la microflora láctea es eliminada por los tratamientos térmicos y preservantes químicos, esto conduce a una menor diferenciación de los productos elaborados (Gobbetti et al., 2018; Nunes Silva et al., 2023; Zhao et al., 2024; Velasco et al., 2025). Debido a esto, se siguen aislando y caracterizando cepas BAL provenientes de leche cruda y productos artesanales, capaces de aportar propiedades organolépticas deseadas, con el fin de aplicarlas como potenciales cultivos iniciadores de uso comercial (Ruvalcaba-Gómez et al., 2022; Shi y Maktabdar, 2022; Mahony et al., 2023; Zommara et al., 2023).

### **3.1. Bacterias ácido lácticas con actividad anticlostridial**

Varios trabajos científicos han aislado cepas BAL con actividad inhibitoria contra *Clostridium* a partir de leche cruda y productos lácteos producidos artesanalmente. Asimismo, la efectividad de estos aislamientos como cultivos biopreservantes ha sido evaluada en quesos elaborados a escala piloto. También, diversas investigaciones han purificado y caracterizado los compuestos antimicrobianos responsables de la actividad anticlostridial, generalmente bacteriocinas, así como determinado las condiciones óptimas para estimular la biosíntesis de estos metabolitos. Algunas de las cepas BAL estudiadas han sido seleccionadas para emplearlas como cultivos bioprotectores comerciales. A continuación se mencionan distintos estudios realizados dentro de esta línea de investigación, así como los cultivos anticlostridiales disponibles en el mercado.

La Nisina es la única bacteriocina que puede emplearse como preservante químico de grado alimentario por su status GRAS, que fue otorgado en base a los múltiples estudios científicos que la han caracterizado. Existen diversos productos de Nisina comercialmente disponibles. Esta bacteriocina fue originalmente detectada en cepas de *Lactococcus lactis*, aunque existen cepas de otras especies de BAL que también la producen. Inhibe el crecimiento de bacterias Gram-positivas como *Bacillus* y *Clostridium*, contra los cuales también actúa impidiendo la germinación de sus esporas, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Thermoanaerobacterium* y *Geobacillus* (Kmiha et al., 2021; Soltani et al., 2022; Wang et al., 2023; Kopolos et al., 2025).

En queso Vidagio, empleando la cepa IPLA 729 de *L. lactis* subsp. *lactis*, productora de Nisina Z, se logró disminuir 3 log<sub>10</sub> el recuento de una cepa contaminante de *C. tyrobutyricum*, respecto al queso control elaborado con un cultivo *starter* comercial y suplementado con nitratos (Rilla et al., 2003). En quesos semiduros *Lactococcus lactis* IFLP 3593 productora de lacticina 3147



inhibió el crecimiento de *Clostridium* spp., *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y lactobacilos heterofermentativos causantes de hinchazón (Martínez-Cuestas et al., 2010). La cepa *L. lactis* subsp. *lactis* INIA 415 productora de Lacticina 481 y Nisina, impidió la germinación de esporas de *C. beijerinckii* en quesos elaborados con leche de oveja durante 120 días de maduración (Garde et al., 2011b).

En queso Cheddar, Hassan (2020) evaluó la actividad inhibitoria contra *C. tyrobutyricum* de un cultivo *starter* formulado con las cepas *L. lactis* subsp. *lactis* 32 Nisina-positiva, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CUC222 y *L. lactis* subsp. *lactis* CUC-H. Luego de seis meses de maduración, se determinó una reducción de 1 log<sub>10</sub> en el recuento de *C. tyrobutyricum*. En queso Kashar, Demirbaş et al. (2022) evaluaron la inhibición de *C. sporogenes* producida por un cultivo iniciador compuesto por una cepa de *L. lactis* subsp. *lactis* y una de *Lactiplantibacillus plantarum*, ambas con actividad anticlostridial. El cultivo iniciador provocó una disminución de 1 log<sub>10</sub> en el recuento de *C. sporogenes* en el queso almacenado a 4 °C, respecto al queso sin el cultivo bioprotector. En queso fresco se logró prevenir el crecimiento de *C. sporogenes* durante tres meses de almacenamiento, empleando las cepas anticlostridiales *L. lactis* subsp. *lactis* (PY91K) y *Lactiplantibacillus plantarum* (Y48) (Demirbaş et al., 2024).

Morandi et al. (2025) evaluaron la producción de Nisina por cinco cepas de *Lactococcus lactis* aisladas de leche cruda y quesos artesanales, al cultivarlas en diferentes condiciones de temperatura y concentración de sal que simulaban las existentes en distintas etapas del proceso de elaboración quesera. En dichas condiciones, sólo una cepa fue capaz de mantener la producción de Nisina en concentraciones adecuadas para inhibir el desarrollo de *Clostridium*.

Se han aislado varias cepas de *Streptococcus thermophilus* con actividad bacteriocinogénica, aunque pocas se han estudiado en profundidad, entre ellas la cepa ACA-DC 0040 aislada de queso Feta es productora de termofilina T que inhibe el crecimiento de *Clostridium* spp. y otras BAL, mientras que *S. thermophilus* SBT 1277 nativa de leche cruda, sintetiza termofilina 1277 que presenta actividad antimicrobiana contra *C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes*, *C. butyricum*, *Bacillus cereus*, así como otras BAL. La cepa *S. thermophilus* NCC 2008 pertenece a la colección de cepas de Nestlé y produce termofilina 13, cuyo espectro de acción inhibitoria incluye a *Clostridium botulinum*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus* y *L. monocytogenes* (Aktypis et al., 1998; Kabuki et al., 2007; Kaminarides et al., 2017; Salini et al., 2023; Kuley et al., 2024). A partir de queso elaborado con leche cruda se aisló la cepa Adria 91L580 de *S. thermophilus* que tiene actividad antimicrobiana contra *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. sporogenes*, *B. cereus* y *Brochothrix thermosphacta*. Mathot et al. (2003) determinaron que esta cepa fue capaz de inhibir a *C. tyrobutyricum* durante 20 días en queso. Asimismo, encontraron que en condición de co-cultivo con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, la cepa Adria 91L580 produjo concentraciones mayores de bacteriocina. Morandi y Brasca (2012) aislaron cuatro cepas de *S. thermophilus* de quesos tradicionales italianos, las cuales tuvieron acción inhibitoria contra *C. tyrobutyricum*.

La cepa ACA-DC 198 de *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus* fue aislada de queso Kasseri y es productora de macedocina y macedovicina. La macedocina presenta actividad antimicrobiana contra *C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y varias especies BAL. Por otra parte, el espectro de acción de la macedovicina incluye a *C. sporogenes*, *C. tyrobutyricum*, *Bacillus licheniformis* y estreptococos orales (De Vuyst y Tsakalidou, 2008; Georgalaki et al., 2013; Musnadi et al., 2021). Anastasiou et al. (2007) emplearon la cepa ACA-DC 198 como cultivo iniciador starter y adjunto para la elaboración de queso Kasseri, en ambos casos comprobaron la presencia de la cepa y la producción de macedocina durante los 90 días que duró la maduración, así como una reducción en los recuentos de los diferentes microorganismos contaminantes considerados en el estudio.

Christiansen et al. (2005) aislaron cepas de *Lacticaseibacillus* con actividad anticlostridial a partir de quesos semiduros, mayoritariamente pertenecientes a *Lacticaseibacillus paracasei*. La cepa LHS de *L. casei* proveniente de vino es productora de caseicina LHS que muestra actividad inhibitoria contra *C. tyrobutyricum*, *B. cereus* y otras BAL (Figueroa-González et al., 2010). En queso tipo Latteria, Di Filippo et al. (2022) cuantificaron el ácido butírico producido por una cepa de *C. tyrobutyricum* a lo largo de su maduración al utilizar lisozima y una cepa de *L. casei* proveniente de queso Grana Padano como cultivo adjunto. Los resultados fueron comparados con los obtenidos al emplear lisozima sola y en combinación con la cepa biopreservante comercial *L. casei* LC 4P1. La investigación detectó los niveles más bajos de ácido butírico al emplear la cepa de *L. casei* en estudio combinada con lisozima, siendo similares a los existentes en el queso adicionado con lisozima y sin agregado de esporas de *C. tyrobutyricum* (queso control).

Por otra parte, *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG que es empleada como cultivo starter para producir alimentos probióticos, presenta acción antibacteriana contra *Clostridium* (Ephraim et al., 2013). La cepa LC705 de *L. rhamnosus* que suele ser empleada como cultivo adjunto en ciertas variedades de quesos, es capaz de inhibir a *C. tyrobutyricum*, así como a hongos y levaduras (Savijoki et al., 2011; Irlinger et al., 2017).

Monteiro et al. (2019) determinaron en forma *in vitro* que la cepa ATCC 8014 de *Lactiplantibacillus plantarum* tiene actividad inhibitoria contra *C. butyricum*, *C. perfringens* y *C. difficile*. Renoldi et al. (2024) aislaron de queso Montasio 34 cepas de *Lacticaseibacillus paracasei* y dos cepas de *Lacticaseibacillus rhamnosus* que presentaron actividad inhibitoria contra *C. sporogenes*, *C. beijerinckii* y *C. butyricum*. Además, dieciocho de las cepas de *L. paracasei* también fueron capaces de inhibir el desarrollo de al menos una cepa de *C. tyrobutyricum*. Seis de las cepas de *L. paracasei* evaluadas en el estudio anterior, fueron empleadas por Trevisiol et al. (2025) para formular cuatro cultivos adjuntos biopreservantes cuya efectividad fue evaluada en queso Montasio. Ninguno de los cultivos permitió el desarrollo de *Clostridium* durante los 120 días de maduración de los quesos y no afectaron las características sensoriales de éstos.

Se han caracterizado diversas bacteriocinas producidas por *Lactiplantibacillus plantarum*, denominadas plantaricinas, cuyos espectros de inhibición incluyen a *C. sporogenes*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, algunas especies de enterobacterias y distintas especies de BAL. Algunas de las plantaricinas estudiadas son la plantaricina 423 de *L. plantarum* 423 proveniente de cerveza de sorgo y la plantaricina TF711 sintetizada por *L. plantarum* TF711 autóctona de queso de cabra (van Reenen et al., 1998; González y Zárate, 2015; Abdulhussain Kareem y Razavi, 2019). La cepa B21 de *L. plantarum* fue aislada de un embutido tradicional vietnamita y es capaz de inhibir diversas bacterias Gram-positivas entre ellas *C. perfringens* y *L. monocytogenes* mediante producción de ácidos orgánicos y bacteriocinas, entre ellas la Plantaciclina B21AG (Golneshin et al., 2020).

La cepa P13 de *E. faecium* proveniente de un embutido, produce una bacteriocina denominada Enterocina P que inhibe a *Clostridium* spp., *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Propionibacterium* spp. y varios géneros de BAL (De Kwaadsteniet et al., 2006). Dal Bello et al. (2010) aislaron cuatro cepas de *Enterococcus faecalis* de quesos artesanales italianos que tuvieron actividad antimicrobiana contra *C. tyrobutyricum* y *L. monocytogenes*. Morandi et al. (2013) hallaron en un queso elaborado con leche cruda una cepa de *Enterococcus lactis* que presentó acción inhibitoria contra *C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes*, *E. faecalis*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium* y *Pseudomonas syringae*. Los investigadores también determinaron que el aislamiento carece de resistencia a antibióticos de importancia clínica y factores de virulencia.

En quesos procesados almacenados a 7 y 25 °C, Sadek et al. (2017) evaluaron el efecto antibacteriano de *Leuconostoc mesenteroides* B-118 sobre *C. perfringens*, al emplearla sola y en combinación con *Lactobacillus acidophilus*. En dicho estudio se determinó que los quesos inoculados únicamente con la cepa B-118 presentaron recuentos nulos de *C. perfringens* a partir de los 21 días de ser almacenados a 7 °C, mientras que en los quesos mantenidos a 25 °C esto ocurrió a los 30 días. La combinación de las dos cepas BAL suprimió completamente a *C. perfringens* a partir de los 21 días de almacenamiento a ambas temperaturas. Por otra parte, *Leuconostoc lactis* APC 3969 que es nativa de leche bovina cruda, produce la bacteriocina Leucociclicina C activa contra *C. tyrobutyricum*, *C. perfringens*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Lactococcus* (de Farias et al., 2025). La cepa *Leuconostoc gelidum* UAL 187 fue aislada de carne envasada al vacío y sintetiza Leucocina A, esta bacteriocina tiene acción antimicrobiana contra *Clostridium*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus* y otros géneros de BAL (Grujović et al., 2022).

La cepa K7 de *Lactobacillus gasseri* que fue aislada de las heces de un recién nacido, presenta actividad antimicrobiana contra las células vegetativas y las esporas de *Clostridium* (Ritter et al., 2009). Bogovič Matijašić et al. (2007) constataron en queso semiduro una reducción en la tasa de germinación de esporas de *C. tyrobutyricum* y menor producción de ácido butírico al emplear la cepa K7 como cultivo adjunto.

Existen pocos cultivos de cepas BAL anticlostridiales disponibles a nivel comercial. La compañía Chr. Hansen (Hørsholm, Dinamarca) tiene una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* productora Nisina denominada BS-10. La empresa Bioprox (Levallois-Perret, Francia) cuenta con una cepa de *Lactococcus lactis* que también sintetiza Nisina, vendida como Bioprox L135. La compañía Danisco (Copenhague, Dinamarca) tiene cuatro tipos de cultivos para el control de *Clostridium*, estos son Holdbac GP 10 LYO que es una cepa de *Pediococcus acidilactici*, Holdbac LC LYO 100 DCU que consiste en una cepa de *Lacticaseibacillus rhamnosus*, Holdbac GP 20 FRO y Holdbac GP 21 FRO, ambos compuestos por cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Nisina-positiva, *Lacticaseibacillus paracasei* y *Lactiplantibacillus plantarum*. La empresa Sacco System (Cadorago, Italia) dispone de una cepa de *Lacticaseibacillus casei* cuyo nombre comercial es LC 4P1, el cultivo LCP 4P2 de *Lacticaseibacillus paracasei*, los cultivos denominados MO N4P01 y MO N4P02 que son mezclas de cepas BAL, de las cuales sólo se indica la presencia de una cepa de *Lactococcus lactis* productora de Nisina, mientras que los cultivos MO L4P03, MO L4P04 y DY 4P13, son combinaciones de cepas BAL no proporcionadas por el proveedor (Danisco, 2016; Gensler et al., 2020; Sacco System, 2021; Bioprox, 2022a,b; Fischer y Titgemeyer, 2023).

En queso fresco, Ağaç et al. (2025) analizaron los recuentos de diferentes microorganismos contaminantes, entre ellos *Clostridium*, al emplear como cultivo adjunto las cepas bioprotectoras comerciales *Lactiplantibacillus plantarum* YM-XPB (Danisco; Copenhague, Dinamarca) y *Lacticaseibacillus rhamnosus* Fresh Q2 (Chr. Hansen; Hørsholm, Dinamarca), en forma individual y combinados, en presencia y ausencia de Nisina y sorbato de potasio. La combinación de ambas cepas bioprotectoras en presencia de Nisina logró la mayor reducción en los recuentos de *Clostridium*.

Peruzy et al. (2022) evaluaron la efectividad del cultivo LC 4P1 para prevenir el desarrollo de *C. sporogenes* ATCC 1143 en queso Grottone. De acuerdo a los resultados obtenidos, el cultivo adjunto no pudo inhibir el crecimiento de *C. sporogenes* y a la aparición de hinchazón tardía, lo que sugiere la importancia del proceso de elaboración y las características fisicoquímicas del producto final.

Los antecedentes existentes en la temática abordada, permiten considerar como alternativa adecuada para prevenir la ocurrencia de hinchazón tardía en los quesos, el empleo de cepas BAL con actividad antimicrobiana contra *Clostridium* spp., como cultivos iniciadores starters o adjuntos compatibles con el proceso de elaboración quesera y las características fisicoquímicas y sensoriales del producto final.

#### **4. Antecedentes del trabajo de tesis**

La línea de investigación desarrollada en la presente tesis doctoral fue iniciada en la tesis de maestría titulada “Selección de bacterias ácido lácticas (LAB) y adjuntas (NSLAB) autóctonas de leche y queso, para el control de *Clostridium* spp. responsables del defecto de hinchazón tardía” (Olivera Rodi, 2018; Olivera Rodi et al., 2020, 2023). En dicho trabajo se evaluó la actividad anticlostridial de cepas BAL provenientes de muestras de leche, quesos y suero lácteo de diez

queserías artesanales. En el estudio se determinó que las cepas 26 y 95 de *Lacticaseibacillus*, así como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 76 inhibieron la totalidad de cepas de *Clostridium* consideradas y su actividad antibacteriana se debía a ácidos orgánicos y compuestos adicionales. En el caso de las cepas 26 y 95, estos metabolitos inhibitorios fueron bacteriocinas y peróxido de hidrógeno, mientras que la cepa 76 sólo produjo peróxido de hidrógeno.

Los estudios realizados en esta investigación buscaron dar continuidad a esta línea de investigación con el fin de disponer de cepas BAL con potencial para prevenir la hinchazón tardía, sin afectar las características fisicoquímicas de los quesos elaborados.

## **5. Objetivo general y específicos**

### **Objetivo general.**

Estudiar el potencial anticlostridial de las cepas 26 y 95 de *Lacticaseibacillus* provenientes de productos lácteos. Determinar la efectividad de las cepas 26 y 95 para inhibir el desarrollo de *Clostridium* spp. en quesos.

### **Objetivos específicos.**

- Determinar las condiciones de cultivo de las cepas 26 y 95 que incrementan la producción de compuestos anticlostridiales, y evaluar la estabilidad de estos compuestos al pH y la temperatura de refrigeración.
- Estudiar parámetros de importancia tecnológica para el uso de las cepas 26 y 95 como cultivos iniciadores adjuntos: compatibilidad con cepas BAL de uso comercial, tolerancia al NaCl, producción de gas y crecimiento en leche.
- Estudiar la actividad anticlostridial de las cepas 26 y 95 en quesos elaborados con dichas cepas como cultivos adjuntos.
- Identificar las cepas 26 y 95 por secuenciación genómica y predecir genes codificantes para la síntesis de bacteriocinas, resistencia a antibióticos, factores de virulencia y presencia de profagos.

## 6. Organización de la tesis

La tesis fue organizada en cuatro capítulos, cada uno de ellos consta de una introducción, materiales y métodos, resultados y discusión, bibliografía y conclusión.

- Capítulo I. Determinación de las condiciones de producción de compuestos anticlostridiales en extractos concentrados y evaluación de su estabilidad.
- Capítulo II. Caracterización tecnológica de las cepas 26 y 95 de *Lacticaseibacillus*.
- Capítulo III. Evaluación de la actividad anticlostridial de las cepas 26 y 95 en queso tipo Dambo.
- Capítulo IV. Identificación y análisis genómico de las cepas 26 y 95.

## 7. Bibliografía

Abdulhussain Kareem, A., & Razavi, S.H. (2019). Plantaricin bacteriocins: as safe alternative antimicrobial peptides in food preservation - a review. *Journal of Food Safety*, Vol. 40, No. 1. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfs.12735>

Ağaç, E., Oraç, A., & Akın, N. (2025). Is there a better way to preserve cheese? Evaluating protective cultures to conventional preservatives. *Food Control*, Vol. 177, 111401. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2025.111401>

Ağagündüz, D., Şahin, T.Ö., Ayten, Ş., Yılmaz, B., Güneşliol, B.E., Russo, P., Spano, G., & Özogul, F. (2022). Lactic acid bacteria as pro-technological, bioprotective and health-promoting cultures in the dairy food industry. *Food Bioscience*, Vol. 47, No. 101617. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101617>

Ajao, O., Banwo, K., Ogunremi, O., & Sanni, A. (2018). Antimicrobial properties and probiotic potentials of lactic acid bacteria isolated from raw beef in Ibadan, Nigeria. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, Vol. 8, No. 2, 770 - 773. DOI: <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2018.8.2.770-773>

Akbal, S., & Öner, Z. (2024). Inhibition of *Clostridium* species responsible for late-blowing defect using different antimicrobial agents. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, Vol. 61, No. 1, 33 - 40. DOI: <https://doi.org/10.21162/PAKJAS/24.57>

Aktypis, A., Kalantzopoulos, G., Huis in't Veld, J.H.J., & ten Brink, B. (1998). Purification and characterization of thermophilin T, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 84, No. 4, 568 - 576. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00383.x>

Anastasiou, R., Georgalaki, M., Manolopoulou, E., Kandarakis, I., De Vuyst, L., & Tsakalidou, E. (2007). The performance of *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 as starter culture in Kasseri cheese production. *International Dairy Journal*, Vol. 17, No. 3, 208 - 217. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.02.011>

Aranda, C., Rodriguez, R., Fernández-Baldo, M.A., & Durán, P. (2025). Mycotoxins in cheese: assessing risks, fungal contaminants, and control strategies for food safety. *Foods*, Vol. 14, No. 3, 351. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods14030351>

Arias, C. (2013). Recuento y caracterización de *Clostridium* spp. en la ración unifeed y en la leche en relación con las condiciones higiénico-sanitarias y de manejo de las ganaderías de oveja manchega. [Tesis Doctoral, Universidad de Castilla-La Mancha]. Dialnet. <http://hdl.handle.net/10578/3604>

Arnaboldi, S., Benevenia, R., Bertasi, B., Galuppini, E., Mangeri, L., Tilola, M., Bassi, D., Cocconcilli, P.S., Stroppa, A., & Varisco, G. (2021). Validation of a real-time PCR method on pta gene for *Clostridium tyrobutyricum* quantification in

milk. Food Control, Vol. 130, 108250. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108250>

Ávila, M., Calzada, J., Muñoz-Tébar, N., Sánchez, C., Ortiz de Elguea-Culebras, G., Carmona, M., Molina, A., Berruga, M.I., & Garde, S. (2023a). Inhibitory activity of aromatic plant extracts against dairy-related *Clostridium* species and their use to prevent the late blowing defect of cheese. Food Microbiology, Vol. 110, 104185. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104185>

Ávila, M., Gómez-Torres, N., Delgado, D., Gaya, P., & Garde, S. (2017). Industrial-scale application of *Lactobacillus reuteri* coupled with glycerol as a biopreservation system for inhibiting *Clostridium tyrobutyricum* in semi-hard ewe milk cheese. Food Microbiology, Vol. 66, 104 - 109. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.010>

Ávila, M., Gómez-Torres, N., Gaya, P., & Garde, S. (2020). Effect of a Nisin-producing lactococcal starter on the late blowing defect of cheese caused by *Clostridium tyrobutyricum*. International Journal of Food Science and Technology, Vol. 55, No. 10, 3343 - 3349. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.14598>

Ávila, M., Sánchez, C., Calzada, J., Mayer, M.J., Berruga, M.I., López-Díaz, T.M., Narbad, A., & Garde, S. (2023b). Isolation and characterization of new bacteriophages active against *Clostridium tyrobutyricum* and their role in preventing the late blowing defect of cheese. Food Research International, Vol. 163, 112222. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112222>

Bachmann, H.-P. (1999). Technologische einflussfaktoren auf die buttersäuregärung. Agrarforschung, Vol. 6, 137 - 140.

Barzideh, Z., Siddiqi, M., Mohamed, H.M., & LaPointe, G. (2022). Dynamics of starter and non-starter lactic acid bacteria populations in long-ripened Cheddar cheese using propidium monoazide (PMA) treatment. Microorganisms, Vol. 10, No. 8, 1669. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081669>

Bassi, D., Cappa, F., & Cocconcelli, P.S. (2009). A combination of SEM technique and X-rays microanalysis for studying the spore germination process of *Clostridium tyrobutyricum*. Research in Microbiology, Vol. 160, No. 5, 322 - 329. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.04.003>

Bassi, D., Puglisi, E., & Cocconcelli, P.S. (2015). Understanding the bacterial communities of hard cheese with blowing defect. Food Microbiology, Vol. 52, 106 - 118. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.07.004>

Bemfeito, R.M., Rodrigues, J.F., e Silva, J.G., & Abreu, L.R. (2016). Temporal dominance of sensations sensory profile and drivers of liking of artisanal Minas cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. Journal of Dairy Science, Vol. 99, No. 10, 7886 - 7897. DOI: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11056>



Bermúdez, J., González, M.J., Olivera, J.A., Burgueño, J.A., Juliano, P., Fox, E.M., & Reginensi, S.M. (2016). Seasonal occurrence and molecular diversity of clostridia species spores along cheesemaking streams of 5 commercial dairy plants. *Journal of Dairy Science*, Vol. 99, No. 5, 3358 - 3366. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10079>

Bettera, L., Levante, A., Bancalari, E., Bottari, B., Cirlini, M., Neviani, E., & Gatti, M. (2023). *Lactocaseibacillus* strains isolated from raw milk: screening strategy for their qualification as adjunct culture in cheesemaking. *Foods*, Vol. 12, No. 12, 3949. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12213949>

Biango-Daniels, M.N., & Wolfe, B.E. (2021). American artisan cheese quality and spoilage: A survey of cheesemakers' concerns and needs. *Journal of Dairy Science*, Vol. 104, No. 5, 6283 - 6294. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19345>

Bintsis, T. (2021). Yeast in different types of cheese. *AIMS Microbiology*, Vol. 7, No. 4, 447 - 470. DOI: <https://doi.org/10.3934/microbiol.202102>

Bintsis, T., Mantzouridou, F.T., Lalou, S., Alvanoudi, P., Ordoudi, S.A., Angelidis, A.S., & Fletouris, D. (2024). Correction: comparative analysis of chemical, microbiological, sensory and volatile compound profiles in Manouri PDO and artisanal Manouri cheeses: a preliminary study. *Food and Bioprocess Technology*, Vol. 17, No. 11, 3576 - 3576. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11947-024-03356-6>

Bintsis, T., & Papademas, P. (2024). The application of protective cultures in cheese: a review. *Fermentation*, Vol. 10, No. 3, 117. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation10030117>

Bioprox. (2022a). Bioprox L135. The natural solution against late blowing defect in cheeses. Bioprox innovation 2022. [Technical data sheet]. Levallois-Perret, France.

Bioprox. (2022b). Bioprox L135 for direct vat inoculation. Société Angevine de Biotechnologie BIOPROX. [Technical data sheet No. 644135-03/2022]. Levallois-Perret, France.

Blaya, J., Barzideh, Z., & LaPointe, G. (2018). Symposium review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. *Journal of Dairy Science*, Vol. 101, No. 4, 3611 - 3629. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13345>

Bogovič Matijašić, B., Koman Rajšp, M., Perko, B., & Rogelj, I. (2007). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. *International Dairy Journal*, Vol. 17, No. 2, 157 - 166. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.01.011>

Borreani, G., & Tabacco, E. (2008). Low permeability to oxygen of a new barrier film prevents butyric acid bacteria spore formation in farm corn silage. *Journal of*

Dairy Science, Vol. 91, No. 11, 4272 - 4281. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1151>

Brändle, J., Domig, K.J., & Kneifel, W. (2016). Relevance and analysis of butyric acid producing clostridia in milk and cheese. Food Control, Vol. 67, 96 - 113. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.038>

Burtscher, J., Hobl, L., Kneifel, W., & Domig, K.J. (2020). Short communication: Clostridial spore counts in vat milk of Alpine dairies - A status quo report. Journal of Dairy Science, Vol. 103, No. 3, 2111 - 2116. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17559>

Burtscher, J., Rudavsky, T., Zitz, U., & Domig, K.J. (2024). Specificity of the AMP-6000 method for enumerating *Clostridium* endospores in milk. Foods, Vol. 13, No. 8, 1192. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods13081192>

Campfield, V.D. (2020). Observed defects of Swiss cheese based on the microbiome contribution to the production of organic acids. [Master's thesis, Boise State University]. DOI: <https://doi.org/10.18122/td/1775/boisestate>

Cantisani Fuentes, A., Maltés Franco, F., y Ramos Fernández, M. (2021). Evaluación y desinfección en queserías artesanales en Uruguay. [Tesis de Grado. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República]. Repositorio Colibrí. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/31272>

Carminati, D., Bonvini, B., Rossetti, L., Mariut, M., Zago, M., & Giraffa, G. (2024). Identification and characterization of the microbial agent responsible of an alteration in spoiled, Grana Padano cheese during ripening. Food Control, Vol. 155, 110050. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110050>

Carrillo, W. (2013). Lisozima: actividad antibacteriana y alergenicidad. Actualización en Nutrición, Vol. 14, No. 4, 314 - 326.

Carro, S. (2024). Caracterización de quesos artesanales en Uruguay: situación actual. Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Castro, S.M., Kolomeytseva, M., Casquete, R., Silva, J., Queirós, R., Saraiva, J.A., & Texeira, P. (2017). Biopreservation strategies in combination with mild high pressure treatments in traditional Portuguese ready-to-eat meat sausage. Vol. 19, 65 - 72. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.05.008>

Cecere, P., Gatto, F., Cortimiglia, C., Bassi, D., Lucchini, F., Cocconcelli, P.S., & Pompa, P.P. (2021). Colorimetric point-of-care detection of *Clostridium tyrobutyricum* spores in milk samples. Biosensors, Vol. 11, No. 9, 293. DOI: <https://doi.org/10.3390/bios11090293>

Chilibroste, P. (2015). Carga o productividad? Pasto o concentrado?: mitos y realidades en la intensificación de los sistemas de producción leche en Uruguay. Conferencia: XLIII Jornadas Uruguayas de Buiatría. Centro Médico Veterinario de Paysandú, Vol. 1, 158 - 162.

Chilibroste, P., Battezzato, G., & Fariña, S. (2024). Productivity versus area: the growth dilemma of the Uruguayan dairy sector. *Agrociencia Uruguay*, Vol. 28, No. 1, e1236. DOI: <https://doi.org/10.31285/agro.28.1236>

Christiansen, P., Petersen, M.H., Kask, S., Møller, P.L., Petersen, M., Nielsen, E.W., Vogensen, F.K., & Ardö, Y. (2005). Anticlostridial activity of *Lactobacillus* isolated from semi-hard cheeses. *International Dairy Journal*, Vol. 15, No. 6 - 9, 901 - 909. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.07.022>

Cosentino, C., Paolino, R., Valentini, V., Musto, M., Ricciardi, A., Adduci, F., D'Adamo, C., Pecora, G., & Freschi, P. (2015). Effect of jenny milk addition on the inhibition of late blowing in semihard cheese. *Journal of Dairy Science*, Vol. 98, No. 8, 5133 - 5142. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9458>

Crespo, A., Martín, A., Ruiz-Moyano, S., Benito, M.J., Rufo, M., Paniagua, J.M., & Jiménez, A. (2020). Application of ultrasound for quality control of Torta del Casar cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, Vol. 103, No. 10, 8808 - 8821. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18160>

D'Incecco, P. (2017). The late blowing defect in Grana Padano cheese: the mechanisms of milk healing through natural creaming and the effects of cheese making conditions in inducing *Clostridium* spore germination. [Doctoral thesis, Università degli Studi di Milano]. UNITesi. <http://hdl.handle.net/2434/487141>

Dal Bello, B., Rantsiou, K., Bellio, A., Zeppa, G., Ambrosoli, R., Civera, T., & Coccolin, L. (2010). Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 43, No. 7, 1151 - 1159. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.03.008>

Danisco. (2016). Holdbac™ LC LYO 100 DCU. [Technical data sheet No. 13541063]. Copenhagen, Denmark.

de Farias, F.M., Soria, M.C., O'Connor, P.M., Huang, X., Buttner, C., Kamilari, E., Deliephan, A., Hill, D., Fursenko, O., Wiese, J., Draper, L., Stanton, C., Hill, C., & Ross, R.P. (2025). *Leuconostoc lactis* strain APC 3969 produces a new variant of cyclic bacteriocin leucocyclicin Q and displays potent anti-*Clostridium* perfringens activity. *Scientific Reports*, Vol. 15, No. 1, 6372. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-89450-x>

De Kwaadsteniet, M., Fraser, T., Van Reenen, C.A., & Dicks, L.M.T. (2006). Bacteriocin T8, a Novel Class IIa sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* T8, isolated from vaginal secretions of children infected with human immunodeficiency virus. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, No. 7, 4761 - 4766. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.00436-06>

De Vuyst, L., & Tsakalidou, E. (2008). *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations. *International Dairy*

Journal, Vol. 18, No. 5, 476 - 485. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.10.006>

Demirbaş, F., Dertli, E., & Arıcı, M. (2022). Prevalence of *Clostridium* spp., in Kashar cheese and efficiency of *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* mix as a biocontrol agents for *Clostridium* spp. Food Bioscience, 46, 101581. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101581>

Demirbaş, F.N., Arıcı, M., & Dertli, E. (2024). Utilisation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (PY91K) and *Lactiplantibacillus plantarum* (Y48) to control *Clostridium sporogenes* during Turkish white cheese production and storage. International Journal of Food Science and Technology, Vol. 59, No. 8, 5642 - 5650. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.17288>

Dereser Puyana, L. (2020). Parámetros de competitividad y calidad del sector lácteo en 11 países del mundo. Unidad de Seguimiento de Precios de Leche. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

Di Filippo, G., Marino, M., Brasca, M., Maifreni, M., & Innocente, N. (2022). Activity of *Lacticaseibacillus casei* to prevent late blowing in raw milk cheeses. Scienza e Tecnica Lattiero Casearia, Vol. 72, No. 04, 57 - 63. DOI: <https://doi.org/10.36138/stlc.04.2022.03>

Di Renzo, T., Reale, A., Nazzaro, S., Siano, F., Addeo, F., & Picariello, G. (2023). Shotgun proteomics for the identification of yeasts responsible for pink/red discoloration in commercial dairy products. Food Research International, Vol. 169, 112945. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112945>

Diarra, C., Goetz, C., Gagnon, M., Roy, D., & Jean, J. (2023). Biofilm formation by heat-resistant dairy bacteria: multispecies biofilm model under static and dynamic conditions. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 89, No. 10. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.00713-23>

Díaz Muro, M.C. (2020). Detección de esporos de clostridios butíricos en leche de vaca y oveja mediante PCR a tiempo real y métodos microbiológicos. [Tesis de Maestría, Universidad de Zaragoza]. Zeguan Repositorio Institucional de Documentos. <https://zaguan.unizar.es/record/96273>

Dirección Nacional de Estadísticas Agropecuarias [DIEA]. (2024). Anuario estadístico agropecuario 2024.

Dobson, A.D.W. (2017). Mycotoxins in cheese (Chapter 23). In P.L.H. McSweeney, P.F. Fox, T.M. Cogan, & T.P. Guinee (Eds.), Cheese: chemistry, physics and microbiology. (4th. ed., pp. 595 - 601). Academic Press. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00023-5>

Domenech, A., y Venturino, M. (2011). Evaluación de la calidad higiénico-sanitaria de quesos elaborados con leche ovina en el Campo Experimental No. 1, Migués, Canelones. [Tesis de Grado, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República]. Repositorio Colibrí. <http://hdl.handle.net/20.500.12008/19938>

Doyle, C.J., Gleeson, D., Jordan, K., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., & Cotter, P.D. (2015). Anaerobic sporeformers and their significance with respect to milk and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 197, 77 - 87. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.022>

Doyle, C.J., O'Toole, P.W., & Cotter, P.D. (2018). Genomic characterization of sulphite reducing bacteria isolated from the dairy production chain. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 9, 1507. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01507>

El-Prince, E., Ahmed, A.-H.A., Abdel-Haleem, A.A., & Amin, M.M. (2018). Studies on anaerobic bacteria in some cheeses sold in Assiut city, Egypt. *Journal of Advanced Veterinary Research*, Vol. 8, No. 4, 84 - 89.

Ellner, R. (2016). Aseguramiento de la calidad en pequeñas queserías. XXII Congreso Nacional Lechero de Costa Rica.

Ephraim, E., Schultz, R.D., & Safdar, N. (2013). *Lactobacillus rhamnosus* GG protects cells from *Clostridium difficile* toxins. *Microbiology Research Journal International*, Vol. 3, No. 2, 165 - 175. DOI: <https://doi.org/10.9734/BMRJ/2013/3068>

Ertürkmen, P., & Öner, Z. (2023). Challenging the problematic detection of clostridial isolates causing late-blowing defect with MALDI-TOF MS. *Czech Journal of Food Sciences*, Vol. 41, No. 1, 36 - 43. DOI: <https://doi.org/10.17221/199/2022-cjfs>

Esteban, M., Marcos, P., Horna, C., Galan-Malo, P., Mata, L., Pérez, M.D., Calvo, M., & Sánchez, L. (2020). Evaluation of methods for DNA extraction from *Clostridium tyrobutyricum* spores and its detection by qPCR. *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 169, 105818. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105818>

Falih, M.A., Altemimi, A.B., Alkaisy, Q.H., Awlqadr, F.H., Abedelmaksoud, T.G., Amjadi, S., & Hesarinejad, M.A. (2024). Enhancing safety and quality in the global cheese industry: a review of innovative preservation techniques. *Heliyon*, e40459. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e40459>

Figuroa-González, I., Hernández-Sánchez, H., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M., & Cruz-Guerrero, A. (2010). Antimicrobial effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota co-cultivated with *Escherichia coli* UAM0403. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, Vol. 9, No. 1, 11 - 16.

Fischer, S. W., & Titgemeyer, F. (2023). Protective cultures in food products: from science to market. *Foods*, Vol. 12, No. 7, 1541. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12071541>

Garbowska, M., Berthold-Pluta, A., Stasiak-Róžańska, L., & Pluta, A. (2021). The impact of the adjunct heat-treated starter culture and *Lb. helveticus* LH-B01 on



the proteolysis and ACE inhibitory activity in Dutch-type cheese Model during ripening. *Animals*, Vol. 11, No. 9, 2699. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani11092699>

García-Cano, I., Rocha-Mendoza, D., Ortega-Anaya, J., Wang, K., Kosmerl, E., & Jiménez-Flores, R. (2019). Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 103, No. 13, 5243 - 5257. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09844-6>

García-Díez, J., & Saraiva, C. (2021). Use of starter cultures in foods from animal origin to improve their safety. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, Vol. 18, No. 5, 2544. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph18052544>

Garde, S., Arias, R., Gaya, P., & Nuñez, M. (2011a). Occurrence of *Clostridium* spp. in ovine milk and Manchego cheese with late blowing defect: identification and characterization of isolates. *International Dairy Journal*, Vol. 21, No. 4, 272 - 278. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.11.003>

Garde, S., Ávila, M., Arias, R., Gaya, P., & Nuñez, M. (2011b). Outgrowth inhibition of *Clostridium beijerinckii* spores by a bacteriocin-producing lactic culture in ovine milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 150, No. 1, 59 - 65. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.018>

Garde, S., Ávila, M., Arias, R., & Núñez, M. (2012). Sugars and organic acids in raw and pasteurized milk Manchego cheeses with different degrees of late blowing defect. *International Dairy Journal*, Vol. 25, No. 2, 87 - 91. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.01.005>

Garde, L.-B.S., Gómez-Torres, N., & Ávila, A.M. (2018). Spore-forming bacteria in dairy products (Chapter 2). In P. Poltronieri (Ed.), *Microbiology in dairy processing: challenges and opportunities* (1st. ed. , pp. 11 - 36). Wiley Blackwell. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119115007.ch2>

Garnier, L., Valence, F., & Mounier, J. (2017). Diversity and control of spoilage fungi in dairy products: an update. *Microorganisms*, Vol. 5, No. 3, 42. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030042>

Gensler, C.A., Brown, S.R.B., Aljasir, S.F., & D'Amico, D.J. (2020). Compatibility of commercially produced protective cultures with common cheesemaking cultures and their antagonistic effect on foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, Vol. 83, No. 6, 1010 - 1019. DOI: <https://doi.org/10.4315/jfp-19-614>

Georgalaki, M., Papadimitriou, K., Anastasiou, R., Pot, B., Van Driessche, G., Devreese, B., & Tsakalidou, E. (2013). Macedovicin, the second food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Food Microbiology*, Vol. 33, No. 1, 124 - 130. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.008>

Geronikou, A., Srimahaeak, T., Rantsiou, K., Triantafillidis, G., Larsen, N., & Jespersen, L. (2020). Occurrence of yeasts on White-Brined Cheeses: methodologies for identification, spoilage potential and good manufacturing practices. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 11, 582778. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582778>

Giroux, H.J., Lemaire, N., & Britten, M. (2022). Effect of cheese composition and cheese-making conditions on salt and moisture transfer during brining. *International Dairy Journal*, Vol. 129, No. 105325. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105325>

Gobbetti, M., Di Cagno, R., Calasso, M., Neviani, E., Fox, P.F., & De Angelis, M. (2018). Drivers that establish and assembly the lactic acid bacteria biota in cheeses. *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 78, 244 - 254. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.010>

Golneshin, A., Gor, M.-C., Williamson, N., Vezina, B., Van, T.T.H., May, B.K., & Smith, A.T. (2020). Discovery and characterisation of circular bacteriocin plantacyclin B21AG from *Lactiplantibacillus plantarum* B21. *Heliyon*, Vol. 6, No. 8, e04715. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04715>

Gómez-Torres, N., Ávila, M., Narbad, A., Mayer, M.J., & Garde, S. (2019). Use of fluorescent CTP1L endolysin cell wall-binding domain to study the evolution of *Clostridium tyrobutyricum* during cheese ripening. *Food Microbiology*, Vol. 78, 11- 17. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.018>

González, L., & Zárate, V. (2015). Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* TF711 against *Clostridium sporogenes* when used as adjunct culture in cheese manufacture. *Journal of Dairy Research*, Vol. 82, No. 2, 236 - 241. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0022029915000126>

González Cocaro, I.R., Rabaquino Sarti, L., y Rodriguez Muniz, G. (2017). Uso de optigraph para estimar capacidad coagulativa de leche de vaca en un rodeo comercial. [Tesis de Grado. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República]. Repositorio Colibrí. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/24969>

Grujović, M.Ž., Mladenović, K. G., Semedo-Lemsaddek, T., Laranjo, M., Stefanović, O.D., & Kocić-Tanackov, S.D. (2022). Advantages and disadvantages of non-starter lactic acid bacteria from traditional fermented foods: potential use as starters or probiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol. 21, No. 2, 1537 - 1567. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12897>

Guaita, A., Gambi, L., Baresi, P., Paterlini, F., Bolzoni, G., Zanardi, G., & Daminelli, P. (2024). Spore-Forming clostridia in raw cow milk from northern Italy: a trend analysis over the past 20 years. *Foods*, Vol. 13, No. 22, 3638. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods13223638>

Hassan, H. (2020). Rôle potentiel des cultures bioprotectrices et de leurs métabolites à activité antimicrobienne pour le contrôle de *Clostridium*

*tyrobutyricum* dans les produits laitiers fermentés. [Thèse de doctorat, Université Laval]. Bibliothèque de l'Université Laval.  
<https://hdl.handle.net/20.500.11794/67234>

Hassan, H., St-Gelais, D., Gomaa, A., & Fliss, I. (2021). Impact of Nisin and Nisin-producing *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* on *Clostridium tyrobutyricum* and bacterial ecosystem of cheese matrices. *Foods*, Vol. 10, No. 4, 898. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10040898>

Havlíková, Š., Kvasničková, E., Kavková, M., & Němečková, I. (2018). The anticlostridial effect of lactococcal and enterococcal adjunct starters in Dutch-type low-scalded cheese. *International Journal of Dairy Technology*, Vol. 71, No. suppl. 1, 107 - 119. DOI: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12508>

Hymery, N., Vasseur, V., Coton, M., Mounier, J., Jany, J.-L., Barbier, G., & Coton, E. (2014). Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol. 13, No. 4, 437 - 456. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12069>

Instituto Nacional de la Leche (INALE). (s.f.). Uruguay lechero. Recuperado el 15 de octubre de 2025. <https://www.inale.org/uruguay-lechero/>

Instituto Nacional de la Leche (INALE). (2011). Seminario: Sustentabilidad ambiental de los sistemas lecheros en un contexto económico de cambios. Serie actividades de difusión No. 663.

Instituto Nacional de la Leche (INALE). (2025). Situación 2024 y perspectivas 2025 de la lechería uruguaya. Informes INALE No. 25.

Irlinger, F., Helinck, S., & Jany, J.L. (2017). Secondary and adjunct cultures (Chapter 11). In P.L.H. McSweeney, P.F. Fox, T.M. Cogan, & T.P. Guinee (Eds.), *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. (4th. ed., pp. 301 - 334). Academic Press. DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-443-15956-5.00044-0>

Johnson, M. (2014). Crystallization in cheese. *Dairy Pipeline*, Vol. 26, No. 3. College of Agricultural and Life Sciences, University of Wisconsin-Madison.

Kabuki, T., Uenishi, H., Seto, Y., Yoshioka, T., & Nakajima, H. (2009). A unique lantibiotic, thermophilin 1277, containing a disulfide bridge and two thioether bridges. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 106, No. 3, 853 - 862. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04059.x>

Kaminarides, S., Aktypis, A., Koronios, G., Massouras, T., & Papanikolaou, S. (2017). Effect of 'in situ' produced bacteriocin thermophilin T on the microbiological and physicochemical characteristics of Myzithra whey cheese. *International Journal of Dairy Technology*, Vol. 71, S1, 213 - 222. DOI: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12448>



Kapalos, J., Giannopoulou, D., Papadimitriou, K., & Koliadima, A. (2025). A comprehensive review of emulsion-based Nisin delivery systems for food safety. *Foods*, Vol. 14, No. 8, 1338. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods14081338>

Kaya, H.I., Simsek, O., & Akgunoglu, O. (2023). Diversity of *Clostridium* spp. causing late blowing in Kaşar cheese and their behaviour against various antimicrobials. *International Dairy Journal*, Vol. 139, 105560. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105560>

Khan, D. (2017). Studying microflora of semi-hard cheese, and sporulation within contact surface biofilms. [Master's thesis, South Dakota State University]. Open PRAIRIE. <https://openprairie.sdstate.edu/etd/1726>

Kiran-Yildirim, B., Titiz-Sargut, S., & Sayan, P. (2018). Calcium lactate pentahydrate crystallization in the presence of pentanoic acid. *Chemical Engineering & Technology*, Vol. 41, No. 6, 1244 - 1251. DOI: <https://doi.org/10.1002/ceat.201700672>

Klijn, N., Nieuwenhof, F.F.J., Hoolwerf, J., van der Waals, C.B., & Weerkamp, A.H. (1995). Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 61, No. 8, 2919 - 2924. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.61.8.2919-2924.1995>

Klijn, A., Yinghua, X., Bayliss, C., Li, H., Cabon, A., De Benito, A., Antonie-Zijlstra, S., Bauer Ellingsen, A., & Wells-Bennik, M.H.J. (2025). Overview of endospore-forming bacteria in food: the road towards a harmonised method for the enumeration of their spores. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 432, 111046. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.111046>

Kmiha, S., Aouadhi, C., Aziza, K., Bejaoui, A., & Maaroufi, A. (2021). Comparison of synergistic effect of Nisin and monolaurin on the inactivation of three heat resistant spores studied by design of experiments in milk. *Journal of Food Quality*, Vol. 2021, 1- 13. DOI: <https://doi.org/10.1155/2021/9977646>

Kuley, E., Kazgan, N., Sakarya, Y., Balıkcı, E., Ozogul, Y., Yazgan, H., & Özyurt, G. (2024). Bioactivity of microencapsulated cell-free supernatant of *Streptococcus thermophilus* in combination with thyme extract on food-related bacteria. *Foods*, Vol. 13, No. 2, 329. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods13020329>

Lampien, A. (2023). Addressing cheese quality defects with emphasis on late blowing in aged White Cheddar. [Master's thesis, School of Food Science, Washington State University]. DOI: <https://doi.org/10.7273/000005089>

Lazzi, C., Povoio, M., Locci, F., Bernini, V., Neviani, E., & Gatti, M. (2016). Can the development and autolysis of lactic acid bacteria influence the cheese volatile fraction? The case of Grana Padano. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 233, 20 - 28. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.009>

Le Bourhis, A.-G., Doré, J., Carlier, J.-P., Chamba, J.-F., Popoff, M.-R., & Tholozan, J.-L. (2007). Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 113, No. 2, 154 - 163. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.027>

Licon, C.C., Moro, A., Librán, C.M., Molina, A.M., Zalacain, A., Berruga, M.I., & Carmona, M. (2020). Volatile transference and antimicrobial activity of cheese made with ewes' milk fortified with essential oils. *Foods*, Vol. 9, No. 35. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods9010035>

Lizarralde, C., Picasso, V., Rotz, C.A., Cadenazzi, M., & Astigarraga, L. (2014). Practices to reduce milk carbon footprint on grazing dairy farms in southern Uruguay: case studies. *Sustainable Agriculture Research*, Vol. 3, No. 2. DOI: <https://doi.org/10.5539/sar.v3n2p1>

Lodi, R. (1990). The use of lysozyme to control butyric acid fermentation. *Bulletin of International Dairy Federation*, Vol. 251, 51 - 54.

Mahony, J., Bottacini, F., & van Sinderen, D. (2023). Towards the diversification of lactococcal starter and non-starter species in mesophilic dairy culture systems. *Microbial Biotechnology*, Vol. 16, No. 9, 1745 - 1754. DOI: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14320>

Mainente, F., Fratea, C., Simonato, B., Zoccatelli, G., & Rizzi, C. (2017). The food allergy risk management in the EU labelling legislation. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, Vol. 30, No. 2, 275 - 285. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10806-017-9668-5>

Makki, G.M., Kozak, S.M., Jencarelli, K.G., & Alcaine, S.D. (2020). Evaluation of the efficacy of commercial protective cultures against mold and yeast in Queso Fresco. *Journal of Dairy Science*, Vol. 103, No. 11, 9946 - 9957. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18769>

Margalho, L.P., Kamimura, B.A., Brexó, R.P., Alvarenga, V.O., Cebeci, A.S., Janssen, P.W.M., Dijkstra, A., Starrenburg, M.J.C., Sheombarsing, R.S., Cruz, A.G., Alkema, W., Bachmann, H., & Sant'Ana, A.S. (2021). High throughput screening of technological and biopreservation traits of a large set of wild lactic acid bacteria from Brazilian artisanal cheeses. *Food Microbiology*, Vol. 100, 103872. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103872>

Martin, N.H., Torres-Frenzel, P., & Wiedmann, M. (2021). Invited review: Controlling dairy product spoilage to reduce food loss and wast. *Journal of Dairy Science*, Vol. 104, No. 2, 1251 - 1261. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19130>

Martínez-Cuesta, M.C., Bengoechea, J., Bustos, I., Rodríguez, B., Requena, T., & Peláez, C. (2010). Control of late blowing in cheese by adding lacticin 3147-producing *Lactococcus lactis* IFPL 3593 to the starter. *International Dairy Journal*, Vol. 20, No. 1, 18 - 24. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.07.005>

Martini, S., Sola, L., Cattivelli, A., Cristofolini, M., Pizzamiglio, V., Tagliazucchi, D., & Solieri, L. (2024). Cultivable microbial diversity, peptide profiles, and bio-functional properties in Parmigiano Reggiano cheese. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 15, 1342180. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1342180>

Mathot, A.G., Beliard, E., & Thuault, D. (2003). *Streptococcus thermophilus* 580 produces a bacteriocin potentially suitable for inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in hard cheese. *Journal of Dairy Science*, Vol. 86, No. 10, 3068 - 3074. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(03\)73906-x](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(03)73906-x)

Millet, M., & Casabianca, F. (2019). Sharing values for changing practices, a lever for sustainable transformation? The case of farmers and processors in interaction within localized cheese sectors. *Sustainability*, Vol. 11, No. 17, 4520. DOI: <https://doi.org/10.3390/su11174520>

Moawad, R.M.S., & Khalil, O.S.F. (2021). Evaluation of chemical and microbiological quality of white pickled soft cheese consumed in Minia governorate. *Scientific Journal of Agricultural Sciences*, Vol. 3, No. 2, 277 - 283. DOI: <https://doi.org/10.21608/sjas.2021.78042.1105>

Monteiro, C.R.A.V., do Carmo, M.S., Melo, B.O., Alves, M.S., dos Santos, C.I., Monteiro, S.G., Bomfim, M.R.Q., Fernandes, E.S., & Monteiro-Neto, V. (2019). *In vitro* antimicrobial activity and probiotic potential of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* against species of *Clostridium*. *Nutrients*, Vol. 11, No. 2, 448. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11020448>

Mora, M., Veijalainen, A.-M. and Heinonen-Tanski, H. (2018). Performic acid controls better *Clostridium tyrobutyricum* related bacteria than peracetic acid. *Sustainability*, Vol. 10, No. 11, 4116. DOI: <https://doi.org/10.3390/su10114116>

Morandi, S., Battelli, G., Silvetti, T., Tringali, S., Nunziata, L., Villa, A., Acquistapace, A., & Brasca, M. (2021). Impact of salting and ripening temperatures on late blowing defect in Valtellina Casera PDO cheese. *Food Control*, Vol. 120, 107508. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107508>

Morandi, S., & Brasca, M. (2012). Safety aspects, genetic diversity and technological characterisation of wild-type *Streptococcus thermophilus* strains isolated from north Italian traditional cheeses. *Food Control*, Vol. 23, No. 1, 203 - 209. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.07.011>

Morandi, S., Silvetti, T., Bonazza, F., Siciliano, R.A., Mazzeo, M.F., Stuknyte, M., De Noni, I., & Brasca, M. (2025). Effect of cheese-making and ripening processes on the anti-*Clostridium* activity of *Lactococcus* strains. *Food Research International*, Vol. 209, 116239. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.116239>

Morandi, S., Silvetti, T., & Brasca, M. (2013). Biotechnological and safety characterization of *Enterococcus lactis*, a recently described species of dairy

origin. Antonie van Leeuwenhoek, Vol. 103, No. 1, 239 - 249. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9806-z>

Morandi, S., Silveti, T., & Brasca, M. (2022). Content and spatial distribution of dairy-related *Clostridium* spores in Grana Padano cheese during the ripening period. LWT - Food Science and Technology, Vol. 167, 113850. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113850>

Muharram, L.H., Haryanto, H., Pertiwi, W., Hernahadini, N., & Mukaromah, I. (2025). *Weissella paramesenteroides*: a lactic acid bacteria producing glutathione from fermented vegetable based Keciwis leaf. Jurnal Biodjati, Vol. 10, No. 1, 55 - 65.

Mucchetti, G., & Zambrini, A.V. (2018). Milk quality and processing (Chapter 1.1.1). In F. Contò, M.A. Del Nobile, M. Faccia, A.V. Zambrini, & A. Conte (Eds.), Advances in Dairy Products (1st. ed., 4 - 20). John Wiley & Sons Ltd. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781118906460.ch1a>

Murphy, S.C., Martin, N.H., Barbano, D.M., & Wiedmann, M. (2016). Influence of raw milk quality on processed dairy products: how do raw milk quality test results relate to product quality and yield?. Journal of Dairy Science, Vol. 99, No. 12, 10128 - 10149. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11172>

Musnadi, A.A., Malik, A., & Khayyira, A.S. (2021). Bioactive fractions from *Streptococcus macedonicus* MBF 10-2 produced in an optimized plant-based peptone medium fermentation. Indonesian Journal of Pharmacy, Vol. 32, No. 1, 52 - 63. DOI: <https://doi.org/10.22146/ijp.1054>

Negash, A.W., & Tsehai, B.A. (2020). Current application of bacteriocins. International Journal of Microbiology, Vol. 2020, 4374891. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/4374891>

Nescier, I., Ramos, E., De María, M., Bonzi, E., Bonvin, C., y Thomas, J. (2015). Vías de contaminación con esporas generadoras de gas butírico (*Clostridium*) a partir del silaje consumido por las vacas lecheras. FAVE, Sección Ciencias Agrarias, Vol. 14, No. 1, 91 - 106. DOI: <https://doi.org/10.14409/fa.v14i1/2.5711>

Nikoloudaki, O. (2021). Raw cows milk microbial composition and correlation to multiple farming conditions with deeper insights on the lactic microbiome and its related functionality for traditional cheese making. [PhD dissertation, Faculty of Science and Technology]. The Bozen-Bolzano Institutional Archive. <https://hdl.handle.net/10863/34233>

Nunes Silva, B., Texeira, J.A., Cadavez, V., & Gonzalez-Barron, U. (2023). Mild heat treatment and biopreservatives for artisanal raw milk cheeses: reducing microbial spoilage and extending shelf-life through thermisation, plant extracts and lactic acid bacteria. Foods, Vol. 12, No. 17, 3206. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12173206>

Observatory of Economic Complexity (OEC). (2023). Cheese [Data set]. <https://oec.world/en/profile/hs/cheese>

Ojeda, M., Etaio, I., Fernández Gil, M.P., Albisu, M., Salmerón, J., & Pérez Elortondo, F.J. (2015). Sensory quality control of cheese: going beyond the absence of defects. *Food Control*, Vol. 51, 371 - 380. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.11.034>

Oliveira, R.B.A., Margalho, L.P., Nascimento, J.S., Costa, L.E.O., Portela, J.B., Cruz, A.G., & Sant'Ana, A.S. (2016). Processed cheese contamination by spore-forming bacteria: a review of sources, routes, fate during processing and control. *Trends in Food Sciences & Technology*, Vol. 57, 11 - 19. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.008>

Olivera Rodi, J. (2018). Selección de bacterias ácido lácticas (LAB) y adjuntas (NSLAB) autóctonas de leche y queso, para el control de *Clostridium* spp. responsables del defecto de "hinchazón tardía". [Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, Universidad de la República]. Repositorio Colibrí. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/21466>

Olivera Rodi, J., González Ramos, M.J., Díaz Gadea, P., & Reginensi, S.M. (2020). Screening of anti-clostridial lactic acid bacteria strains isolated from Uruguayan dairy farms. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, Vol. 9, No. 6, 1170 - 1175. DOI: <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.9.6.1170-1175>

Olivera Rodi, J., González Ramos, M.J., Díaz Gadea, P., & Reginensi, S.M. (2023). Study of the inhibitory effect of *Lactobacillus* strains and lysozyme on growth of *Clostridium* spp. responsible for cheese late blowing defect. *Nova Biotechnologica et Chimica*, e1229. DOI: <https://doi.org/10.34135/nbc.1229>

Ong, L., Li, X., Ong, A., & Gras, S.L. (2022). New insights into cheese microstructure. *Annual Review of Food Science and Technology*, Vol. 13, No. 1, 89 - 115. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051812>

Ordonho Carneiro, K., Zampieri Campos, G., Scafuro Lima, J. M., da Silva Rocha, R., Vaz-Velho, M., & Dimitrov Todorov, S. (2024). The role of lactic acid bacteria in meat products, not just as starter cultures. *Foods*, Vol. 13, No. 19, 3170. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods13193170>

Ortakci, F., Broadbent, J.R., Oberg, C.J., & McMahon, D.J. (2015). Growth and gas production of a novel obligatory heterofermentative Cheddar cheese nonstarter lactobacilli species on ribose and galactose. *Journal of Dairy Science*, Vol. 98, No. 6, 3645 - 3654. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9293>

Özogul, F., & Hamed, I. (2018). The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 58, No. 10, 1660 - 1670. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1277972>



Pantaléon, V., Bouttier, S., Soavelomandroso, A.P., Janoir, C., & Candela, T. (2014). Biofilms of *Clostridium* species. *Anaerobe*, Vol. 30, 193 - 198. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.09.010>

Pasquali, F., Valero, A., Possas, A., Lucchi, A., Crippa, C., Gambi, L., Manfreda, G., De Cesare, A. (2022). Occurrence of foodborne pathogens in Italian soft artisanal cheeses displaying different intra- and inter-batch variability of physicochemical and microbiological parameters. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 13, 959648. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.959648>

Peralta, G.H., Bergamini, C.V., Wold, I.V., Perotti, M.C., & Hynes, E.R. (2018). Adjunct cultures from non-starter lactic acid bacteria (Chapter 3). In M.H.F. Henriques and C.J.D. Pereira (Eds.), *Cheese. Production, consumption and health benefits* (1st. ed., pp. 39 - 96). Nova Science Publishers, Inc.

Peruzy, M.F., Blaiotta, G., Aponte, M., De Sena, M., & Murru, N. (2022). Late blowing defect in Grottone cheese: detection of clostridia and control strategies. *Italian Journal of Food Safety*, Vol. 11, No. 2, 10162. DOI: <https://doi.org/10.4081/ijfs.2022.10162>

Podrzaj, L., Burtscher, J., Küller, F., & Domig, K.J. (2020). Strain-dependent cheese spoilage potential of *Clostridium tyrobutyricum*. *Microorganisms*, Vol. 8, No. 11, 1836. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111836>

Postollec, F., Mathot, A.-G., Bernard, M., Divanac'h, M.-L., Pavan, S., & Sohier, D. (2012). Tracking spore-forming bacteria in food: from natural biodiversity to selection by processes. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 158, No. 1, 1 - 8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.004>

Prado Martin, J.G., & Cotter, P.D. (2023). Filamentous fungi in artisanal cheeses: a problem to be avoided or a market opportunity?. *Heliyon*, Vol. 9, No. 4, e15110. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15110>

Psomas, E., Sakaridis, I., Boukouvala, E., Karatzia, M.-A., Ekateriniadou, L.V., & Samouris, G. (2023). Indigenous lactic acid bacteria isolated from raw Graviera cheese and evaluation of their most important technological properties. *Foods*, Vol. 12, No. 2, 370. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12020370>

Putri, D.A., Lei, J., Rossiana, N., & Syaputri, Y. (2024). Biopreservation of food using bacteriocins from lactic acid bacteria: classification, mechanisms, and commercial applications. *International Journal of Microbiology*, Vol. 2024, 8723968. DOI: <https://doi.org/10.1155/ijm/8723968>

Qian, C., Martin, N.H., Wiedmann, M., & Trmčić, A. (2022). Development of a risk assessment model to predict the occurrence of late blowing defect in Gouda cheese and evaluate potential intervention strategies. *Journal of Dairy Science*, Vol. 105, No. 4, 2880 - 2894. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21206>

Randazzo, C. L., Liotta, L., Angelis, M.D., Celano, G., Russo, N., Hoorde, K.V., Chiofalo, V., Pino, A., & Caggia, C. (2021). Adjunct culture of non-starter lactic

acid bacteria for the production of Provola Dei Nebrodi PDO cheese: *in vitro* screening and pilot-scale cheese-making. *Microorganisms*, Vol. 9, No. 1, 179. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010179>

Reginensi, S.M., Olivera, J.A., Bermúdez, J., & González, M.J. (2016). *Lactobacillus* in the dairy industry: from natural diversity to biopreservation resources (Chapter 4). In S. Castro-Sowinski (Ed.), *Microbial models: from environmental to industrial sustainability*. *Microorganisms for sustainability* (Vol. 1, pp. 57 - 81). Springer, Singapore. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-981-10-2555-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-10-2555-6_4)

Reinheimer, J. (2022). Los quesos argentinos. Producción, características y nuevas propuestas. Colección Ciencia y Tecnología. Ediciones UNL. Santa Fe, Argentina.

Ren, S., Yuan, X., Liu, F., Fang, F., Iqbal, H.M.N., Zahran, S.A., & Bilal, M. (2022). Bacteriocin from *Lactocaseibacillus rhamnosus* sp. A5: isolation, purification, characterization, and antibacterial evaluation for sustainable food processing. *Sustainability*, Vol. 14, No. 15, 9571. DOI: <https://doi.org/10.3390/su14159571>

Renoldi, N., Innocente, N., Rossi, A., Brasca, M., Morandi, S., & Marino, M. (2024). Screening of aroma-producing performance of anticlostridial *Lactocaseibacillus casei* strains for use as adjunct cultures in cheesemaking. *Food and Bioprocess Technology*. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11947-023-03311-x>

Rilla, N., Martínez, B., Delgado, T., & Rodríguez, A. (2003). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Vidagio cheese by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 729, a Nisin Z producer. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 85, No. 1 - 2, 23 - 33. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00478-6](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00478-6)

Ritschard, J.S., & Schuppler, M. (2024). The microbial diversity on the surface of smear-ripened cheeses and its impact on cheese quality and safety. *Foods*, Vol. 13, No. 2, 214. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods13020214>

Ritter, P., Kohler, C., & von Ah, U. (2009). Evaluation of the passage of *Lactobacillus gasseri* K7 and bifidobacteria from the stomach to intestines using a single reactor model. *BMC Microbiology*, Vol. 9, No. 87. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-87>

Rosa, A.L., y Arbeletche, P. (2016). Tipologías de productores lecheros de la cuenca litoral norte del Uruguay, con base en el CGA 2011. *Cangüé*, No. 37, 34 - 40.

Rossi, F. (2023). Special Issue “Functional Characterization of Lactic Acid Bacteria”: Editorial. *Microorganisms*, Vol. 11, No. 5, 1190. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051190>

Ruusunen, M., Surakka, A., Korkeala, H., & Lindström, M. (2012). *Clostridium tyrobutyricum* strains show wide variation in growth at different NaCl, pH, and

temperature conditions. Journal of Food Protection, Vol. 75, No. 10, 1791 - 1795. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-12-109>

Ruvalcaba-Gómez, J.M., Ruiz-Espinosa, H., Méndez-Robles, M.D., Arteaga-Garibay, R.I., Anaya-Esparza, L.M., Villagrán, Z., & Delgado-Macuil, R.J. (2022). Use of autochthonous lactic acid bacteria as starter culture of pasteurized milk Adobera cheese. Fermentation, Vol. 8, No. 5, 234. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation8050234>

Sacco System. (2021). 4 Protection. Food cultures with protective effect. [Technical data sheet]. Cadorago, Italy.

Sadek, Z.I., Refaat, B.M., El-Shakour, E. H.A., Mehanna, N.S., & Hassan, M.S. (2017). Biocontrol of processed cheese by incorporation of probiotic bacteria and its metabolites. International Journal of Dairy Science, Vol. 12, No. 2, 93 - 104. DOI: <https://doi.org/10.3923/ijds.2017.93.104>

Şahiner, A., Çalışkan, S., & Halat, E. (2023). Quantitative detection of late blowing agents *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, and *C. sporogenes* in traditional Turkish cheese by multiplex real-time PCR. Food Analytical Methods, Vol. 16, 781 - 786. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12161-023-02454-z>

Saito, M.M. (2014). Defectos más comunes en los quesos. Chr. Hansen.

Salini, F., Iacumin, L., Comi, G., & Dicks, L. (2023). Thermophilin 13: *In silico* analysis provides new insight in genes involved in bacteriocin production. Microorganisms, Vol. 11, No. 3, 611. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030611>

Sánchez, C., Garde, S., Landete, J.M., Calzada, J., Baker, D.J., Evans, R., Narbad, A., Mayer, M.J., & Ávila, M. (2024). Identification, activity and delivery of new LysFA67 endolysin to target cheese spoilage *Clostridium tyrobutyricum*. Food Microbiology, Vol. 117, 104401. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104401>

Savijoki, K., Lietzén, N., Kankainen, M., Alatossava, T., Koskenniemi, K., Varmanen, P., & Nyman, T.A. (2011). Comparative proteome cataloging of *Lactobacillus rhamnosus* strains GG and Lc705. Journal of Proteome Research, Vol. 10, No. 8, 3460 - 3473. DOI: <https://doi.org/10.1021/pr2000896>

Shi, C., & Maktabdar, M. (2022). Lactic acid bacteria as biopreservation against spoilage molds in dairy products – A review. Frontiers in Microbiology, Vol. 12, 819684. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.819684>

Silva, S.P.M., Texeira, J.A., & Silva, C.C.G. (2023). Prevention of fungal contamination in semi-hard cheeses by whey-gelatin film incorporated with *Levilactobacillus brevis* SJC120. Foods, Vol. 12, No. 7, 1396. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12071396>



Silvetti, T., Morandi, S., & Brasca, M. (2018). Growth factors affecting gas production and reduction potential of vegetative cell and spore inocula of dairy-related *Clostridium* species. *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 92, 32 - 39. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.014>

Singh, B., Kumar, N., Yadav, A., Rohan, & Bhandari, K. (2025). Harnessing the power of bacteriocins: a comprehensive review on sources, mechanisms, and applications in food preservation and safety. *Current Microbiology*, Vol. 82, No. 4. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-025-04155-8>

Soltani, S., Zirah, S., Rebuffat, S., Couture, F., Boutin, Y., Biron, E., Subirade, M., & Fliss, I. (2022). Gastrointestinal stability and cytotoxicity of bacteriocins from Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative *in vitro* study. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 12, 780355. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.780355>

Stadhouders, J. (1990). Prevention of butyric acid fermentation by the use of nitrate. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 251: 40 - 46.

Stadhouders, J., & van den Berg, G. (2012). Use of lysozyme for the prevention of butyric acid fermentation in Gouda cheese. Limited effect of the enzyme. *Milk the vital force: posters presented at the XXII International Dairy Congress*, The Hague. D. Reidel Publishing Company.

Sténeri, C. (2003). El sector de productos lácteos. Quesos. Departamento de Estudios Económicos, Cámara de Industrias del Uruguay.

Strack, L., Cavaleiro Carli, R., Vieira da Silva, R., Bitencourt Sartor, K., Colla, L.M., & Oliveira Reinehr, C. (2020). Food biopreservation using antimicrobials produced by lactic acid bacteria. *Research, Society and Development*, Vol. 9, No. 8, e998986666. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i8.6666>

Summer, A., Franceschi, P., Formaggioni, P., & Malacarne, M. (2014). Characteristics of raw milk produced by free-stall or tie-stall cattle herds in the Parmigiano-Reggiano cheese production area. *Dairy Science & Technology*, Vol. 94, No. 6, 581 - 590. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0181-6>

Tabla, R., Gómez, A., Simancas, A., Rebollo, J.E., Molina, F., & Roa, I. (2018). Early blowing in raw goats' milk cheese: gas production capacity of Enterobacteriaceae species present during manufacturing and ripening. *Journal of Dairy Research*, Vol. 86, No. 3, 331 - 338. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0022029918000511>

Tabla, R., Gómez, A., Rebollo, J.E., Molina, F., & Roa, I. (2022). Effectiveness of a bacteriophage cocktail in reducing cheese early blowing caused by *Escherichia coli*. *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 153, 112430. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112430>

Tabla, R., & Roa, I. (2022). Use of gaseous ozone in soft cheese ripening: effect on the rind microorganisms and the sensorial quality. *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 170, 114066. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114066>

Tang, H.W., Phapugrangkul, P., Fauzi, H.M., & Tan, J.S. (2021). Lactic acid bacteria bacteriocin, an antimicrobial peptide effective against multidrug resistance: a comprehensive review. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, Vol. 28, No.1. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10989-021-10317-6>

Terra, M.I. (2018). Evaluación de los efectos de un tratado de libre comercio entre Uruguay y China en el comercio bilateral de productos lácteos. Informe final.

Tintrop, L.K., Meola, M., Stern, M.T., Haueter, M., Shani, N., Berthoud, H., Guggenbühl Gasser, B., & Fuchsmann, P. (2025). Analytical mapping of Swiss hard cheese to highlight the distribution of volatile compounds, aroma, and microbiota. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, No. 73, No. 12, 7383 - 7392. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c10980.s001>

Todorov, S.D. (2019). What bacteriocinogenic lactic acid bacteria do in milk? (Chapter 8). In L.A. Nero, & F.A. de Carvalho (Eds.), *Raw milk. Balance Between Hazards and Benefits*, (1st. ed., pp. 149 - 174). Academic Press. DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-810530-6.00008-0>

Trevisiol, F., Renoldi, N., Rossi, A., Di Filippo, G., Marino, M., & Innocente, N. (2024). *Lacticaseibacillus casei* as anti-blowing agents: impact on the evolution of ripening and sensory profile of Montasio cheese. *Food and Bioprocess Technology*, Vol. 18, No. 2, 1764 - 1776. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11947-024-03555-1>

Uruguay XXI. (2020). Agronegocios. Informe sectorial. <https://www.uruguayxxi.gub.uy/es/centro-informacion/informes/>

Uruguay XXI. (2024). Informe anual de comercio exterior. <https://www.uruguayxxi.gub.uy/es/centro-informacion/articulo/informe-anual-de-comercio-exterior-2024/>

van Heerden, B. (2023). The world dairy situation report 2023. [www.fil.idf.org](http://www.fil.idf.org)

Van Reenen, C.A., Dicks, L.M.T., & Chikindas, M.L. (1998). Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 84, 1131 - 1137. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00451.x>

Velasco, R., Cabeza, M.C., & Ordóñez, J.A. (2025). Current approaches to minimize the late blowing defect of cheese. *Cogens Food & Agriculture*, Vol. 11, No. 1, 2460462. DOI: <https://doi.org/10.1080/23311932.2025.2460462>

Wang, Y., Fu, X., Wang, Y., Wang, J., Kong, L., & Guo, H. (2024). Antibacterial activity and cytotoxicity of the novel bacteriocin Pkmh. *International Journal of*

Molecular Sciences, Vol. 25, No. 17, 9153. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms25179153>

Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Vol. 9, 612285. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>

Wang, R., Yu, S., Huang, Y., & Liu, Y. (2023). Synthesis, high yield strategy and application of Nisin: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, Vol. 58, No. 6, 2829 - 2841. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.16418>

Wenzel, J.L. (2025). Orígenes y evolución del queso en Uruguay. *Revista TodoTambo*, No. 274, 26 - 35.

Xue, Z., Brooks, J.T., Quart, Z., Stevens, E.T., Kable, M.E., Heidenreich, J., McLeod, J., & Marco, M.L. (2021). Microbiota assessments for the identification and confirmation of slit defect-causing bacteria in milk and Cheddar cheese. *mSystems*, Vol. 6, No. 1, e01114-20. DOI: <https://doi.org/10.1128/msystems.01114-20>

Yeluri Jonnala, B.R., McSweeney, P.L.H., Cotter, P.D., & Sheehan, J.J. (2021). Recreating pink defect in cheese with different strains of *Thermus* bacteria. *International Journal of Dairy Technology*, Vol. 74, No. 4, 700 - 708. DOI: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12800>

Yuan, L., Sadiq, F.A., Liu, T., Li, Y., Gu, J., Yang, H., & He, G. (2018). Spoilage potential of psychrotrophic bacteria isolated from raw milk and the thermo-stability of their enzymes. *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)*, Vol. 19, No. 8, 630 - 642. DOI: <https://doi.org/10.1631/jzus.b1700352>

Zapaśnik, A., Sokołowska, B., & Bryła, M. (2022). Role of Lactic Acid Bacteria in Food Preservation and Safety. *Foods*, Vol. 11, No. 9, 1283. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods11091283>

Zhang, D., Zhang, J., Kalimuthu, S., Liu, J., Song, Z., He, B., Cai, P., Zhong, Z., Feng, C., Neelakantan, P., & Li, Y.-X. (2023). A systematically biosynthetic investigation of lactic acid bacteria reveals diverse antagonistic bacteriocins that potentially shape the human microbiome. *Microbiome*, Vol. 11, 91. DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1868011/v1>

Zhang, T., Zhang, Y., Li, L., Jiang, X., Chen, Z., Zhao, F., & Yi, Y. (2022). Biosynthesis and production of class II bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *Fermentation*, Vol. 8, No. 5, 217. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation8050217>

Zhao, J., Gong, J., Liang, W., & Zhang, S. (2024). Microbial diversity analysis and isolation of thermoresistant lactic acid bacteria in pasteurized milk. *Scientific Reports*, Vol. 14, No. 1. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-80947-5>

Zheng, X., Shi, X., & Wang, B. (2021). A review of general cheese processing technology, flavor biochemical pathways and the influence of yeasts in cheese. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 12, 703284. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.703284>

Zommara, M., El-Ghaish, S., Haertle, T., Chobert, J.-M., & Ghanimah, M. (2023). Probiotic and technological characterization of selected *Lactobacillus* strains isolated from different egyptian cheeses. *BMC Microbiology*, Vol. 23, 160. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02890-1>

# Capítulo I. Estudio de las condiciones de producción de compuestos anticlostridiales en extractos concentrados y evaluación de su estabilidad

## 1. Introducción

Las bacterias ácido lácticas (BAL) pueden controlar el crecimiento de microorganismos contaminantes patógenos y/o alterantes de alimentos a través de diversos metabolitos (Golneshin et al., 2020; Lahiri et al., 2022). La caracterización de estos compuestos antimicrobianos y el estudio de su estabilidad en las condiciones fisicoquímicas existentes en los alimentos, resultan aspectos importantes cuando se desea emplear las cepas BAL que los producen como cultivos biopreservantes en productos alimentarios (Lahari et al., 2022; Singh et al., 2025). Lo anterior, permite asegurar la inocuidad de estos compuestos para la salud humana, definir el espectro de microorganismos que son susceptibles y la efectividad de dichos metabolitos en el producto final (Ren et al., 2022, Lahari et al., 2022; Singh et al., 2025). La realización de estos análisis requiere crecer a las cepas BAL productoras de los metabolitos inhibitorios en las condiciones de cultivo que promueven su producción y purificarlos en la fase de crecimiento asociada a su mayor biosíntesis (Abbasiliasi et al., 2017; Parlindungan et al., 2021; Zhang et al., 2022).

En la actualidad, las bacteriocinas son los compuestos antimicrobianos de mayor interés para el sector académico y la industria alimentaria debido a que son producidas por cepas SLAB y NSLAB autóctonas de los alimentos fermentados. Las bacteriocinas así como las cepas BAL que las producen suelen tener estatus GRAS y no afectan las características sensoriales de los productos elaborados. Además, no generan residuos químicos y pueden emplearse en combinación con otras barreras microbiológicas aplicadas en los procesos de elaboración de alimentos para extender el rango de microorganismos contaminantes que pueden ser inhibidos y/o eliminados (Kaškonienė et al., 2017; Zangeneh et al., 2020; de Farias et al., 2025).

Varios parámetros fisicoquímicos y biológicos inciden en la tasa de producción de bacteriocinas de las cepas BAL, aunque el comportamiento y la relevancia de cada uno de estos factores, depende de la cepa y la bacteriocina en estudio. La síntesis de bacteriocinas varía en las distintas fases del crecimiento bacteriano (Abbasiliasi et al., 2017; Zhang et al., 2019a,b; Salman et al., 2020). Tradicionalmente las bacteriocinas son consideradas compuestos del metabolismo secundario por no resultar esenciales para el desarrollo celular y sólo conferir una ventaja competitiva frente a otros microorganismos en condiciones ambientales adversas (Parlindungan et al., 2021). Asimismo, varias bacteriocinas son expresadas en mayor concentración en la fase de crecimiento estacionaria. Sin embargo, también hay estudios científicos que han detectado bacteriocinas cuya expresión es mayor en la fase de crecimiento exponencial, mientras que en la fase de crecimiento estacionaria ésta decae. Considerando la etapa de crecimiento bacteriano asociado a la biosíntesis de estas bacteriocinas, algunos investigadores las consideran metabolitos primarios (Abbasiliasi et al., 2017; Yang et al., 2018; Parlindungan et al., 2021).

Adicionalmente, debe tenerse en cuenta que las condiciones de crecimiento que resultan óptimas para la producción de biomasa celular no suelen ser las mismas que las asociadas a la mayor biosíntesis de bacteriocina (Abbasiliasi et al., 2017; Parlindungan et al., 2021; Rahmadana et al., 2023). En consecuencia, los parámetros fisicoquímicos deben ser ajustados para promover la actividad bacteriocinogénica pero manteniendo una adecuada tasa de crecimiento celular.

Los medios de cultivos están formulados para optimizar el crecimiento bacteriano en condiciones *in vitro*, pero no para estimular la producción de bacteriocinas, es por ello que algunos de sus componentes como las fuentes de carbono y nitrógeno, así como sus concentraciones, suelen ser modificados para evaluar el efecto en la actividad bacteriocinogénica (Abbasiliasi et al., 2017; Yang et al., 2018). Los compuestos usualmente empleados como fuentes de carbono son carbohidratos como la glucosa, galactosa, lactosa, maltosa y sacarosa (Abbasiliasi et al., 2017; Sabo et al., 2019; Veetil y Chitra, 2022). Con respecto a las fuentes de nitrógeno frecuentemente consideradas, se utiliza extracto de levadura, triptona, extracto de carne y suero de leche, y sales de amonio como el citrato, acetato y sulfato (Abbasiliasi et al., 2017; Sabo et al., 2019; Veetil y Chitra, 2022). Algunas investigaciones también han logrado incrementar la expresión de ciertas bacteriocinas incluyendo iones metálicos como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  los cuales actúan como cofactores de varias enzimas, entre ellas las que participan en la síntesis de bacteriocinas (Zhang et al., 2018; Madrigal Chávez, 2023). Otra hipótesis propuesta es que la incorporación de cationes divalentes, ácidos, bases, o surfactantes como el Tween 20 y Tween 80, facilitan la liberación de las moléculas de bacteriocinas adsorbidas en la superficie celular (Abbasiliasi et al., 2017; Garzón et al., 2017; Steier et al., 2024).

Las condiciones de pH y temperatura también influyen en la expresión de estos metabolitos. En general cuando estos parámetros se encuentran por debajo de los valores asociados al crecimiento óptimo, la producción de bacteriocinas es mayor debido a que hay más energía celular disponible. Esto es así porque los procesos de mantenimiento celular ocurren más lentamente, consumiendo menor cantidad de energía (Abbasiliasi et al., 2017; Ge et al., 2019). Si bien las condiciones de pH y temperatura que son óptimas para la síntesis de bacteriocinas dependen de la cepa productora, varios trabajos han reportado rangos de pH entre 5.5 y 6.0, así como rangos de temperatura entre 25 y 35 °C (Abbasiliasi et al., 2017; Garzón et al., 2017; Yang et al., 2018; Zhang et al., 2018; Ge et al., 2019). Otros factores a tener en cuenta son la aeración y la agitación del medio de cultivo líquido, lo que favorecen la difusión del  $\text{O}_2$  en el medio de cultivo y afecta la expresión génica de proteínas como las bacteriocinas, así como la tasa de crecimiento (Abbasiliasi et al., 2017; Jawan et al., 2021; Veetil y Chitra, 2022; Ramão Contessa et al., 2024). Hay trabajos científicos que reportan una mayor actividad bacteriocinogénica en condiciones de aireación y/o agitación. Sin embargo, otras investigaciones han detectado concentraciones más altas de bacteriocina en anaerobiosis y ausencia de agitación (Abbasiliasi et al., 2017; Hassan et al., 2020; Ramão Contessa et al., 2024). Es importante indicar que la elevada agitación puede provocar degradación de las bacteriocinas, así como estrés mecánico, pudiendo dañar la integridad celular (Jawan et al., 2021; Ramão Contessa et al., 2024).

El uso de bacteriocinas como compuestos biopreservantes efectivos en alimentos, requiere determinar previamente su estabilidad al modificar distintos parámetros fisicoquímicos del proceso de elaboración, así como del producto final. Las variables fisicoquímicas que suelen ser modificadas en la producción de alimentos son el pH, la temperatura y el tiempo de los tratamientos térmicos y refrigeración, concentración de NaCl y otros aditivos químicos, el contenido de enzimas proteolíticas incorporadas y/o producidas por cultivos iniciadores primarios y adjuntos, así como las generadas por microorganismos contaminantes y aditivos químicos frecuentemente empleados en productos alimentarios (Macedo et al., 2017; Al-Hashedi et al., 2019; Zangeneh et al., 2020; Syrokou et al., 2021). Con respecto a la estabilidad de las bacteriocinas frente al pH, en muchos casos son estables en el rango entre 2.0 y 8.0, por lo que son compatibles con la elaboración de productos lácteos fermentados (Hellal et al., 2012; Ge et al., 2019; Ahn y Lee, 2025; Guo et al., 2025).

En relación a la temperatura, las bacteriocinas pertenecientes a las clases I y II son termoestables, siendo capaces de tolerar un tratamiento de 65 °C durante 30 min., o un tratamiento térmico equivalente (Zangeneh et al., 2020). Incluso, hay bacteriocinas como son Plantaricina AA135 y Enterocina E23, que pueden conservar su funcionalidad luego de exponerlas a 121 °C por 15 min. (Beshkova y Frengova, 2012; de Niederhäusern et al., 2020; Afrin et al., 2021). En cuanto al efecto de la refrigeración en la estabilidad de estos compuestos, algunos estudios han reportado bacteriocinas de cepas BAL que permanecen estables durante dos o más meses de almacenamiento a 4 y -20 °C (Beshkova y Frengova, 2012; Al-Hashedi et al., 2019; de Niederhäusern et al., 2020; Afrin et al., 2021). Por otra parte, las bacteriocinas son susceptibles a la acción de diversas proteasas por ser compuestos de naturaleza peptídica (Al-Hashedi et al., 2019). Esto constituye una ventaja desde el punto de vista de la salud humana porque son degradadas por enzimas proteolíticas del aparato digestivo, minimizando la ocurrencia de posibles efectos biológicos sobre células propias y la microflora intestinal (Darbandi et al., 2022; Kim et al., 2023). Sin embargo, los microorganismos presentes en los alimentos también producen proteasas que pueden degradar parte de las bacteriocinas liberadas en la matriz del producto, lo que puede reducir la efectividad de estos compuestos, es por ello que debe evaluarse la susceptibilidad de cada bacteriocina ante distintas proteasas (Ávila et al., 2005; Sure et al., 2016; Zangeneh et al., 2020; Afrin et al., 2021). Entre las enzimas frecuentemente empleadas en los análisis *in vitro* se encuentran  $\alpha$ -quimotripsina, pepsina, tripsina, papaína, proteinasa K y pronasa (Zangeneh et al., 2020; Afrin et al., 2021; Darbandi et al., 2022; Ahn y Lee, 2025). También es necesario determinar la concentración de bacteriocina producida en el propio alimento y monitorear su permanencia a lo largo de su tiempo de conservación (Ávila et al., 2020; Hassan et al., 2021; Darbandi et al., 2022; Abd-Elhamed et al., 2024).

Los estudios comprendidos en este capítulo tuvieron por objetivo determinar las condiciones de cultivo que estimulan la producción de compuestos anticlostridiales por las cepas 26 y 95 de *Lactocaseibacillus*, para su posterior aplicación en la obtención de extractos concentrados. Adicionalmente, se evaluó la estabilidad de dichos extractos concentrados frente al pH y condiciones de refrigeración.

## **2. Materiales y métodos.**

### **2.1 Ajuste de las condiciones de cultivo para incrementar la producción de compuestos anticlostridiales en extractos concentrados**

Se estudiaron las cinéticas de crecimiento de las cepas 26 y 95, así como la producción de sus compuestos anticlostridiales al modificar el pH y las fuentes de carbono y nitrógeno del medio de cultivo, y la temperatura de crecimiento. En el estudio se emplearon matraces Erlenmeyer de 1 L conteniendo 300 mL del medio de cultivo MRS base (Man y Xiang, 2019), compuesto por: triptona (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L), citrato dibásico de amonio (2 g/L), fosfato monobásico de potasio anhidro (1.57 g/L), acetato de sodio anhidro (1.23 g/L), Tween 80 (1 g/L), sulfato de magnesio anhidro (0.51 g/L) y sulfato de manganeso (0.25 g/L).

El estudio se realizó en dos etapas, en primer lugar se analizó el efecto del agregado de la glucosa o lactosa al 2 % como fuente de carbono, en combinación con triptona, extracto de levadura o citrato de amonio al 1 % como fuente de nitrógeno. En el análisis se incluyeron dos controles que consistieron en emplear el medio de cultivo sin fuente de nitrógeno adicionada, pero suplementado con glucosa y lactosa al 2%. Todos los matraces fueron incubados a 37 °C durante 48 h. En una segunda etapa, se evaluó el efecto del pH y la temperatura en el crecimiento bacteriano y la producción de los compuestos anticlostridiales, empleando el medio de cultivo modificado de acuerdo a los resultados obtenidos en la primera etapa, ajustado a pH inicial 5.0, 6.0 y 7.0. Las temperaturas a las que se incubaron los matraces fueron 15, 20 y 37 °C. Las condiciones de crecimiento fueron seleccionadas de acuerdo a lo establecido por otros autores en estudios previos (Iyapparaj et al., 2013; Malini y Savitha, 2015). Todos los ensayos experimentales se realizaron por triplicado.

En las dos etapas del análisis, los matraces fueron inoculados al 10% con suspensiones celulares de las cepas previamente crecidas en caldo MRS durante 24 h a 37 °C, ajustadas a una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.1 (Wayah y Philip, 2018). Las cinéticas de crecimiento se determinaron por recuento en placa a las 0, 5, 8, 24 y 48 horas de haber sembrado las cepas en los matraces. Se realizaron diluciones decimales seriadas en tubos de solución salina fisiológica (NaCl 0.85%) y 100 µL de las diluciones preparadas fueron sembradas en placas de agar MRS. Las placas se incubaron por 24 h a 37 °C en microaerofilia. A las horas mencionadas, también se centrifugaron 20 mL de los cultivos y los sobrenadantes obtenidos fueron ajustados a pH 6.5, tratados con catalasa a concentración final 1 mg/mL e incubados a 37 °C durante 3 horas, para descomponer el peróxido de hidrógeno producido por las cepas. A partir de los sobrenadantes acondicionados se prepararon extractos concentrados mediante precipitación con acetona, concentración 10X mediante rotaevaporación y esterilización por filtración (0.22 µm) (ver punto 2.2).

Para estudiar la producción de los compuestos anticlostridiales a lo largo del tiempo, los extractos concentrados obtenidos a las 8, 24 y 48 h de crecimiento, fueron evaluados por el método de difusión en discos en placas de agar RCM empleando como cepa indicadora de inhibición a *C. tyrobutyricum* ATCC 25755.



Previamente, la cepa fue crecida en caldo RCM durante 16h., el cultivo obtenido se ajustó a una D.O.<sub>620 nm</sub> de 0.47 (equivalente a 10<sup>8</sup> UFC/mL) y fue sembrado en cada placa (100 µL). En discos de papel estéril dispuestos en las placas sembradas se sembraron 100 µL de los extractos concentrados. Las placas fueron incubadas en anaerobiosis estricta a 37 °C por 48 h y el diámetro de los halos de inhibición producidos alrededor de los discos fue medido (Jones et al., 2008; Matamoros et al., 2009).

Adicionalmente, se determinó por el método de microdiluciones, la concentración mínima inhibitoria (MIC) de extractos concentrados pertenecientes a las cepas 26 y 95 contra una suspensión de esporas (10<sup>6</sup> esporas/mL) de la cepa ATCC 25755 de *C. tyrobutyricum* obtenida como se describe en el apartado 2.3. Los extractos concentrados considerados en este análisis se obtuvieron a partir de cultivos de ambas cepas en: I) caldo MRS sin modificar, con 48 de crecimiento a 37 °C; II) caldo MRS modificado e incubado de acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio (ver punto 2.4).

## **2.2 Obtención y purificación de extractos concentrados**

De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo anterior, se utilizó la composición del caldo MRS modificado para obtener los extractos concentrados de las cepas 26 y 95, y realizar estudios posteriores de caracterización de los compuestos anticlostridiales producidos. Ambas cepas fueron previamente cultivadas en caldo MRS por 16 h y ajustadas a 10<sup>8</sup> UFC/mL (D.O.<sub>620 nm</sub> de 0.47). Se inocularon 100 µL de los cultivos acondicionados en matraces Erlenmeyer conteniendo 100 mL del caldo MRS modificado. Los matraces se incubaron en las condiciones de temperatura requeridas para que la síntesis de dichos metabolitos fuese máxima. A partir de los cultivos crecidos se obtuvieron los sobrenadantes por centrifugación (10000 rpm durante 15 min. a 4 °C), éstos fueron ajustados a pH 6.5, tratados con catalasa (1 mg/mL) durante 3 horas a 37 °C, y sometidos a precipitación con acetona siguiendo la metodología de Pal et al. (2010) para purificar las bacteriocinas existentes. En vaso de Bohemia se mezclaron cinco volúmenes de acetona con un volumen de sobrenadante bajo agitación constante en frío, la mezcla se almacenó a -20 °C toda la noche y la acetona se descartó. La acetona residual fue eliminada por evaporación a 37 °C. El precipitado resultante se resuspendió en 20 mL de agua destilada y fue concentrado 10X por rotaevaporación (240 rpm, 70 °C). El extracto concentrado obtenido se esterilizó con filtro de 0.22 µm (Matamoros et al., 2009).

## **2.3 Preparación de suspensiones de esporas bacterianas**

Se prepararon suspensiones de esporas de *C. tyrobutyricum* a partir de cultivos con 48 h de crecimiento a 37 °C en viales conteniendo 10 mL de caldo RCM. Los cultivos resultantes fueron almacenados a 0 °C durante 20 días y analizados mediante tinción de Gram para determinar si el 90 % o más del frotis contenía esporas bacterianas en lugar de células vegetativas. Cada cultivo fue centrifugado a 9000 rpm durante 5 min. a 4 °C. El paquete celular obtenido se lavó tres veces con 5 mL de agua destilada estéril (8000 rpm por 1 min. a 4 °C) y se resuspendió en 1000 µL de agua destilada estéril. Las suspensiones de esporas fueron tratadas térmicamente a 85 °C durante 17 min. y se almacenaron

a -18 °C durante una semana (Ávila et al., 2014; Brändle et al., 2018). Posteriormente, mediante recuento en placa en agar RCM se determinó que la carga de esporas clostridiales presente en cada suspensión de esporas fue  $10^6$  -  $10^7$  esporas/mL.

#### **2.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de extractos concentrados de las cepas 26 y 95 de *Lactocaseibacillus***

La concentración mínima inhibitoria (MIC) de extractos concentrados pertenecientes a las cepas 26 y 95 fue determinada contra las cepas 175.1, 193.5, 206.2 y 206.6 de *C. tyrobutyricum* aisladas de quesos con defecto de hinchazón tardía, mediante el método de microdiluciones en caldo RCM en placa de 96 pocillos (Lim e Im, 2009; Ávila et al., 2014). En cada ensayo experimental se realizaron diluciones seriadas al medio que se dispensaron en seis pocillos de la microplaca (75 µL por pocillo). En cada pocillo se adicionó igual volumen de caldo RCM 2X y 20 µL de una suspensión de esporas ( $10^6$  esporas/mL) de la cepa de *C. tyrobutyricum* correspondiente, preparada de acuerdo al punto 2.2. Se incluyó un blanco, conteniendo 180 µL de caldo RCM 1X, y un control positivo de crecimiento de la cepa de *C. tyrobutyricum* que consistió en mezclar en cada pocillo 75 µL de caldo RCM 2X, 75 µL de agua destilada estéril y 20 µL de la suspensión de esporas clostridiales. Luego de incubar la microplaca a 37 °C durante 24 h en anaerobiosis estricta, en cada pocillo se determinó la absorbancia a 620 nm en un espectrofotómetro Spectrostar Nano (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). Las concentraciones de los extractos se expresan como unidades arbitrarias por ml (UA/ml), representando 1 UA/ml la dilución 1, 0.5 UA/ml la dilución  $\frac{1}{2}$ , 0.25 UA/ml la dilución  $\frac{1}{4}$ , etc. El valor de MIC<sub>50</sub> fue definido como la concentración de extracto a la cual la absorbancia del cultivo fue el 50 % de la existente en el control positivo de crecimiento, y se expresó como unidades arbitrarias por mL (UA/mL) de extracto crudo.

#### **2.5 Determinación del efecto antimicrobiano de los extractos concentrados (bacteriostático o bactericida)**

Se estudió el crecimiento de dos cepas de *C. tyrobutyricum* en presencia de los extractos concentrados de las cepas 26 y 95, para determinar si dichos extractos tienen efecto bacteriostático o bactericida sobre éstas. Las cepas de *C. tyrobutyricum* consideradas en el estudio fueron seleccionadas por presentar la mayor y menor susceptibilidad en el análisis de MIC (punto 2.4). A partir de cultivos bacterianos de las cepas de *C. tyrobutyricum* se prepararon suspensiones de esporas. Cada suspensión, ajustada a  $10^6$  esporas/mL, fue inoculada (100 µL) en diez viales que contenían 10 mL de caldo RCM. Los viales fueron incubados anaeróbicamente a 37 °C durante 39 horas. A las 19 h de haber inoculado los viales, se adicionó el extracto concentrado a concentración final 1xMIC. El recuento bacteriano existente en los viales se determinó a las 0, 8, 11, 15, 19, 22, 24, 32, 35 y 39 horas de ser inoculados. En el análisis se incluyó un control positivo de crecimiento para cada cepa de *C. tyrobutyricum* en ausencia de los extractos concentrados. Cada ensayo experimental se realizó por duplicado.

## **2.6 Efecto del pH y la temperatura de refrigeración en la estabilidad de extractos concentrados**

Se estudió la actividad anticlostridial de los extractos concentrados provenientes de las cepas 26 y 95 durante su conservación en frío y al exponerlos a distintas condiciones de pH por el método de difusión en discos en placas de agar RCM (ver punto 2.1). Las condiciones de temperatura y pH aplicadas se basaron en estudios realizados por otros autores (Fatima y Mebrouk, 2013; Abanoz y Kunduhoglu, 2018). Para evaluar la estabilidad de los extractos concentrados bajo refrigeración, éstos fueron conservados a -20 °C, -18 °C y 4 °C durante 80 días. A los días 0, 20, 40, 60 y 80 se evaluó la actividad anticlostridial remanente en los extractos concentrados sembrándolos en los discos por triplicado. Para evaluar el efecto del pH en la estabilidad de los extractos concentrados, éstos se ajustaron a pH 4, 5, 6 y 7 con HCl 1M o NaOH 1M, se incubaron a 37 °C durante 5 h y fueron reajustados a pH 6.5. También se incluyeron a los extractos concentrados sin modificar como controles positivos de inhibición. Todos los tratamientos fueron sembrados por triplicado. En ambos estudios la actividad anticlostridial remanente se evaluó por medición del diámetro de los halos de inhibición producidos alrededor de los discos y se expresó como el promedio de las tres repeticiones. Los datos obtenidos fueron analizados por el método estadístico One-way ANOVA ( $p < 0.05$ ).

## **3. Resultados y discusión**

### **3.1 Ajuste de las condiciones de cultivo para incrementar la producción de compuestos anticlostridiales en extractos concentrados**

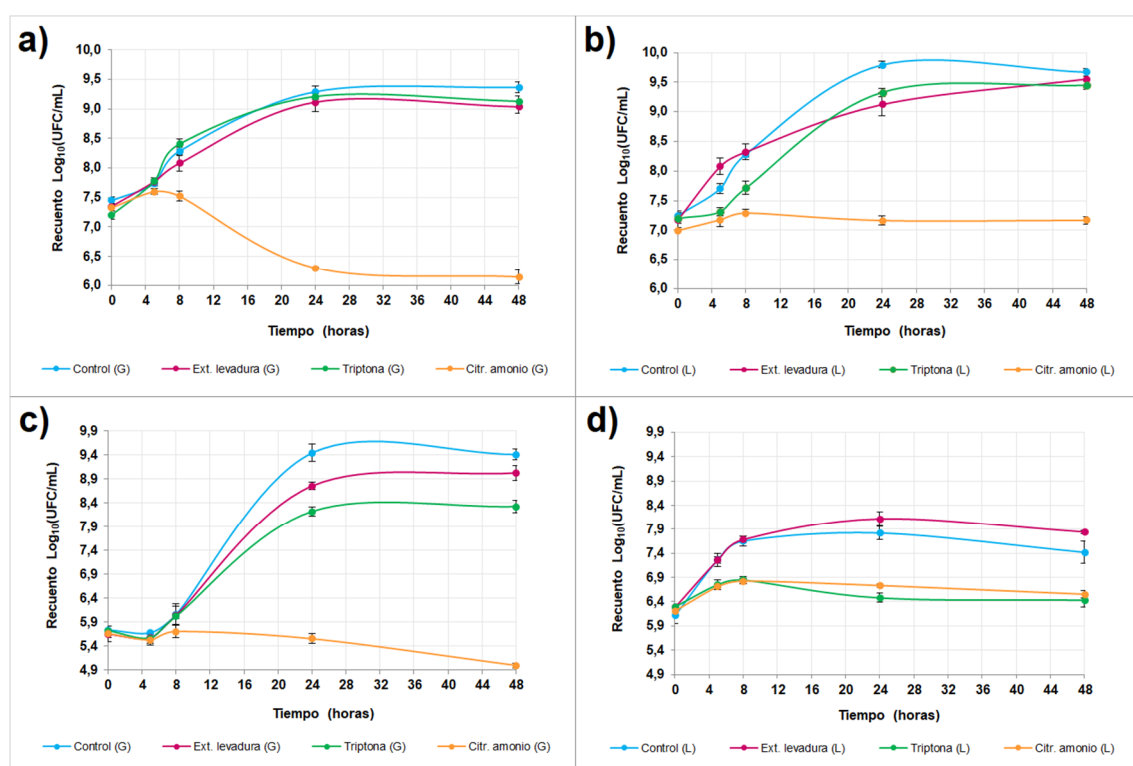
En la primera instancia del estudio se analizaron las cinéticas de crecimiento y la actividad anticlostridial de las cepas 26 y 95 al emplear glucosa y lactosa al 2 % como fuentes de carbono en combinación con triptona, extracto de levadura y citrato de amonio al 1 % como fuentes de nitrógeno. El crecimiento bacteriano y la actividad anticlostridial de las cepas mencionadas, también fueron estudiados en caldo MRS suplementado con glucosa o lactosa al 2%, sin adición de fuente de nitrógeno (controles experimentales).

A partir de las cinéticas de crecimiento en las condiciones experimentales mencionadas (figura 1), se calcularon los parámetros de velocidad de crecimiento (constante K) y la biomasa máxima obtenida (constante M) con el fin de identificar las combinaciones de fuentes de carbono y nitrógeno que resultaron más adecuadas para estimular el crecimiento bacteriano. En el anexo I se adjuntan los gráficos de linealización a partir de los cuales se obtuvo la pendiente de la fase de crecimiento exponencial, utilizada para calcular la constante K en cada condición de cultivo. En la tabla 1 se presentan los valores de las constantes mencionadas en cada condición experimental.

En el análisis comparativo de las cinéticas de crecimiento de *Lactocaseibacillus* 26, se pudo determinar que las tasas de crecimiento y biomásas fueron similares al emplear lactosa o glucosa, independientemente de la fuente de nitrógeno empleada. Específicamente, las constantes K y M presentaron valores más altos

en los cultivos realizados en presencia de lactosa, sin incorporación de fuente de nitrógeno ( $K = 0.24 \text{ h}^{-1}$  y  $M = 6.19 \times 10^9 \text{ UFC/mL}$ ), y en caldo MRS con lactosa y triptona ( $K = 0.24 \text{ h}^{-1}$  y  $M = 2.12 \times 10^9 \text{ UFC/mL}$ ), y fueron similares entre sí. De acuerdo a estos resultados, la lactosa y la triptona serían las fuentes de carbono y nitrógeno más apropiadas para estimular el crecimiento de la cepa 26. El agregado de fuentes de nitrógeno no evidenció un aumento en la producción de biomasa ni en la velocidad de crecimiento de la cepa.

En el estudio comparativo de las cinéticas de crecimiento de *Lacticaseibacillus* 95, se pudo determinar que, independientemente de la fuente de nitrógeno considerada, en presencia de glucosa la cepa alcanzó recuentos bacterianos más altos y la fase de crecimiento exponencial duró más tiempo, que al disponer de lactosa como carbohidrato fermentable (figuras 1c y 1d). Según los parámetros de K y M (tabla 1), la velocidad de crecimiento y la producción de biomasa de *Lacticaseibacillus* 95 fueron más altas al cultivarla en caldo MRS con glucosa pero sin fuente de nitrógeno adicionada ( $K = 0.47 \text{ h}^{-1}$ ;  $M = 2.76 \times 10^9 \text{ UFC/mL}$ ). Los resultados anteriores sugieren que el caldo MRS suplementado únicamente con glucosa es el más adecuado para estimular el crecimiento de la cepa 95.



**Figura 1:** Cinéticas de crecimiento de las cepas 26 (a, b) y 95 (c, d) en caldo MRS base adicionado con glucosa (G) y lactosa (L) al 2%, sin adición de fuente de nitrógeno (control) y en combinación con distintas fuentes de nitrógeno al 1%.

**Tabla 1:** Constantes K (h<sup>-1</sup>) y M (UFC/mL) correspondientes a las cinéticas de crecimiento de las cepas 26 y 95 en caldo MRS base suplementado sólo con glucosa y lactosa (controles), y en combinación con extracto de levadura, triptona y citrato de amonio.

Cepa 26	Glucosa		Lactosa	
	K (h <sup>-1</sup> )	M (UFC/mL)	K (h <sup>-1</sup> )	M (UFC/mL)
Control	0.17	1.92 x 10 <sup>9</sup>	0.24	6.19 x 10 <sup>9</sup>
Extracto de levadura	0.17	1.28 x 10 <sup>9</sup>	0.12	1.32 x 10 <sup>9</sup>
Triptona	0.15	1.60 x 10 <sup>9</sup>	0.24	2.12 x 10 <sup>9</sup>
Citrato de amonio	0.13	1.85 x 10 <sup>7</sup>	0.08	9.62 x 10 <sup>6</sup>
Cepa 95	Glucosa		Lactosa	
	K (h <sup>-1</sup> )	M (UFC/mL)	K (h <sup>-1</sup> )	M (UFC/mL)
Control	0.47	2.76 x 10 <sup>9</sup>	0.45	4.36 x 10 <sup>7</sup>
Extracto de levadura	0.39	5.70 x 10 <sup>8</sup>	0.41	4.63 x 10 <sup>7</sup>
Triptona	0.32	1.67 x 10 <sup>8</sup>	0.16	5.03 x 10 <sup>6</sup>
Citrato de amonio	0.14	4.01 x 10 <sup>5</sup>	0.18	5.08 x 10 <sup>6</sup>

Otros trabajos científicos que han evaluado el crecimiento de cepas de *Lacticaseibacillus* en diferentes carbohidratos, han determinado mayores recuentos bacterianos y velocidad de crecimiento al emplear glucosa como fuente de carbono, probablemente porque es el azúcar más simple y fácil de metabolizar, razón por la cual los microorganismos fermentadores suelen preferir catabolizar este sustrato respecto a otros tipos de carbohidratos (Yin et al., 2015; Abbasiliasi et al., 2017; Reyes-Castillo et al., 2025). Esto fue lo que se constató para la cepa 95. Sin embargo, en el caso de la cepa 26, la lactosa resultó ser la fuente de carbono más adecuada para estimular su crecimiento. Dicho resultado coincide con investigaciones previas que han evaluado el crecimiento de varias cepas de *L. paracasei*, *L. rhamnosus* y *L. casei*. Los estudios antes mencionados han reportado que algunas de las cepas presentaban un mejor desarrollo en presencia de carbohidratos distintos a la glucosa, entre ellos la lactosa, indicando que la fuente de carbono más adecuada para estimular el crecimiento bacteriano puede variar a nivel de cepa (Kondybayev et al., 2022; Suissa et al., 2022; Fuso et al., 2023; Zioga et al., 2025). Por otra parte, la triptona también fue necesaria para estimular el crecimiento de la cepa 26, lo que concuerda con otros trabajos científicos realizadas con cepas de *Lacticaseibacillus* y otros géneros de lactobacilos relacionados. Dichas investigaciones detectaron mayor producción de biomasa de las cepas evaluadas cuando la triptona fue la fuente de nitrógeno empleada. Asimismo, algunos medios de cultivo formulados para el crecimiento de bacterias ácido lácticas, por ejemplo el medio M17, contiene triptona como fuente de nitrógeno (Chang y Liew, 2012; Shahrvay et al., 2012; Arakawa et al., 2015; Hayek et al., 2019; Ayad et al., 2020; Eyahmalay et al., 2020; Zhang et al., 2022).

La actividad bacteriocinogénica de los extractos concentrados correspondientes a las 8, 24 y 48 h de crecimiento de las cepas 26 y 95, fue evaluada por el método

de difusión en discos en agar RCM. Los halos de inhibición producidos por los extractos concentrados fueron analizados cualitativamente (tablas 2 y 3) para determinar las combinaciones de fuentes de carbono y nitrógeno que presentaron mayor actividad inhibitoria.

**Tabla 2:** Actividad anticlostridial (diámetro de halos de inhibición) producida por extractos concentrados de la cepa 26 a las 8, 24 y 48 h de crecimiento en caldo MRS adicionado con glucosa o lactosa sola (control) y en combinación con extracto de levadura, triptona y citrato de amonio.

Fuente de C:	Fuente de N:	8 h	24 h	48 h
Glucosa	Control	+	++	++
	Extracto de levadura	+	+	+
	Triptona	+	-	+
	Citrato de amonio	-	+	+
Lactosa	Control	+	+++	+++
	Extracto de levadura	-	+++	+++
	Triptona	-	-	-
	Citrato de amonio	-	+	+

Diámetro de halo de inhibición:  
 ≤1.2 cm: negativo (-)  
 1.3 - 1.5 cm: positivo (+)  
 1.6 - 1.8 cm: doble positivo (++)  
 ≥1.8 cm: triple positivo (+++)

**Tabla 3:** Actividad anticlostridial (diámetro de halos de inhibición) producida por extractos concentrados de la cepa 95 a las 8, 24 y 48 h de crecimiento en caldo MRS adicionado con glucosa o lactosa sola (control) y en combinación con extracto de levadura, triptona y citrato de amonio.

Fuente de C:	Fuente de N:	8 h	24 h	48 h
Glucosa	Control	-	+	+
	Extracto de levadura	-	-	++
	Triptona	-	-	-
	Citrato de amonio	+	+	++
Lactosa	Control	++	+	+
	Extracto de levadura	+	-	+
	Triptona	+	-	-
	Citrato de amonio	+	-	-

Diámetro de halo de inhibición:  
 ≤1.2 cm: negativo (-)  
 1.3 - 1.5 cm: positivo (+)  
 1.6 - 1.8 cm: doble positivo (++)  
 ≥1.8 cm: triple positivo (+++)

De acuerdo a los resultados obtenidos, la actividad bacteriocinogénica de la cepa 26 fue mayor al cultivarla en presencia de lactosa, en vez de glucosa como fuente

de carbono. A partir de las 24 h de crecimiento, el control adicionado con lactosa y el medio de cultivo conteniendo lactosa y extracto de levadura, fueron las condiciones experimentales en las que se detectó mayor actividad anticlostridial. Con respecto a la cepa 95, a las 48 h de crecimiento los extractos concentrados con mayor actividad inhibitoria fueron los provenientes de los cultivos realizados en glucosa y extracto de levadura, así como en glucosa y citrato de amonio. Es importante mencionar que, si bien el citrato de amonio resultó una fuente de nitrógeno efectiva para estimular la actividad bacteriocinogénica de la cepa 95, no fue adecuado para estimular la velocidad de crecimiento de esta cepa y su biomasa máxima. En base a lo discutido para ambas cepas, el extracto de levadura parece ser la mejor fuente de nitrógeno para estimular la producción de bacteriocinas anticlostridiales. Diferentes estudios realizados por otros investigadores también han reportado un aumento en la actividad bacteriocinogénica de cepas de bacterias ácido lácticas evaluadas al emplear extracto de levadura como fuente de nitrógeno (Furtado et al., 2014; Schirru et al., 2014; Gutiérrez-Cortés et al., 2018; Castilho et al., 2019; Sidooski et al., 2019; Parlindungan et al., 2021).

En cuanto a la fuente de carbono, la lactosa fue la fuente de carbono más propicia para favorecer su actividad bacteriocinogénica de la cepa 26. En cambio, la glucosa resultó más adecuada para estimular la síntesis de bacteriocina por la cepa 95, aunque en presencia de lactosa también se observaron niveles comparables de actividad bacteriocinogénica. Es necesario indicar que las investigaciones que han cuantificado la producción de bacteriocina por cepas de bacterias ácido lácticas al emplear lactosa y glucosa como fuentes de carbono difieren en sus resultados. Muchos de estos estudios detectaron mayor producción de estos metabolitos cuando la glucosa fue el carbohidrato adicionado, mientras que otros han asociado niveles más altos de bacteriocinas en presencia de lactosa. Lo anterior sugiere que el efecto de los carbohidratos en la producción de bacteriocinas depende de la cepa productora evaluada (Furtado et al., 2014; Mohamed et al., 2016; Kaur y Kumar Tiwari, 2017; Gutiérrez-Cortés et al., 2018; Castilho et al., 2019; Sidooski et al., 2019; Saraiva et al., 2020; Parlindungan et al., 2021).

A pesar de lo comentado previamente para la cepa 95, cuya velocidad de crecimiento y producción de biomasa celular fueron mayores cuando se adicionó glucosa como fuente de carbono, en los ensayos posteriores se decidió emplear lactosa como fuente de carbono por ser el carbohidrato fermentable disponible en la matriz del queso. Por lo tanto, se decidió emplear el caldo MRS base adicionado con lactosa al 2 % y extracto de levadura al 1 % para cultivar ambas cepas en los estudios subsiguientes.

La siguiente etapa del estudio consistió en determinar el efecto del pH del medio de cultivo (pH 5, 6 y 7) y la temperatura de crecimiento bacteriano (15, 20 y 37 °C) en la producción de compuestos anticlostridiales. En la figura 2 se comparan las cinéticas de crecimiento de las cepas 26 y 95 al ser cultivadas en las condiciones experimentales ensayadas. La tabla 4 presenta la velocidad de crecimiento (constante K) y la biomasa máxima obtenida (constante M) calculados para cada curva de crecimiento. En el anexo I se adjuntan los gráficos de linealización a partir de los cuales se obtuvo la pendiente de la fase de

crecimiento exponencial, utilizada para calcular la constante K en las condiciones de pH y temperatura consideradas.

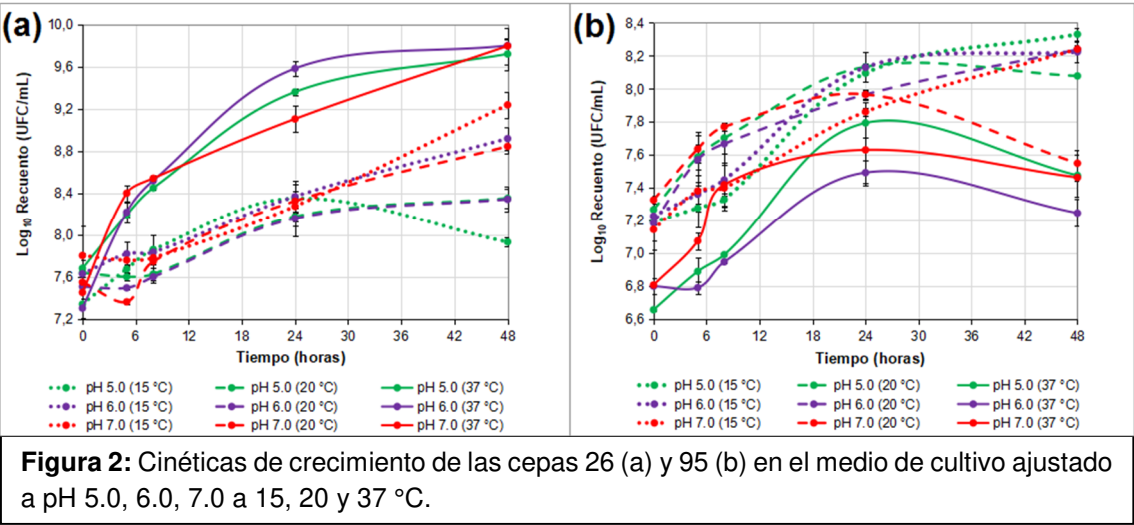


Tabla 4: Constantes K (h <sup>-1</sup> ) y M (UFC/mL) correspondientes a las cinéticas de crecimiento de las cepas 26 y 95 al cultivarlas a 15, 20 y 37 °C en el medio de cultivo ajustado a pH inicial 5.0, 6.0 y 7.0.					
		Cepa 26		Cepa 95	
Temperatura	pH	K (h <sup>-1</sup> )	M (UFC/mL)	K (h <sup>-1</sup> )	M (UFC/mL)
15 °C	5	0.08	2.00 x 10 <sup>8</sup>	0.10	1.99 x 10 <sup>8</sup>
	6	0.06	7.82 x 10 <sup>8</sup>	0.09	1.51 x 10 <sup>8</sup>
	7	0.07	1.65 x 10 <sup>9</sup>	0.08	1.60 x 10 <sup>8</sup>
20 °C	5	0.07	1.80 x 10 <sup>8</sup>	0.06	1.17 x 10 <sup>8</sup>
	6	0.08	1.87 x 10 <sup>8</sup>	0.04	1.58 x 10 <sup>8</sup>
	7	0.11	6.60 x 10 <sup>8</sup>	0.03	7.13 x 10 <sup>7</sup>
37 °C	5	0.14	5.18 x 10 <sup>9</sup>	0.11	5.76 x 10 <sup>7</sup>
	6	0.16	6.26 x 10 <sup>9</sup>	0.08	2.48 x 10 <sup>7</sup>
	7	0.08	6.20 x 10 <sup>9</sup>	0.17	3.63 x 10 <sup>7</sup>

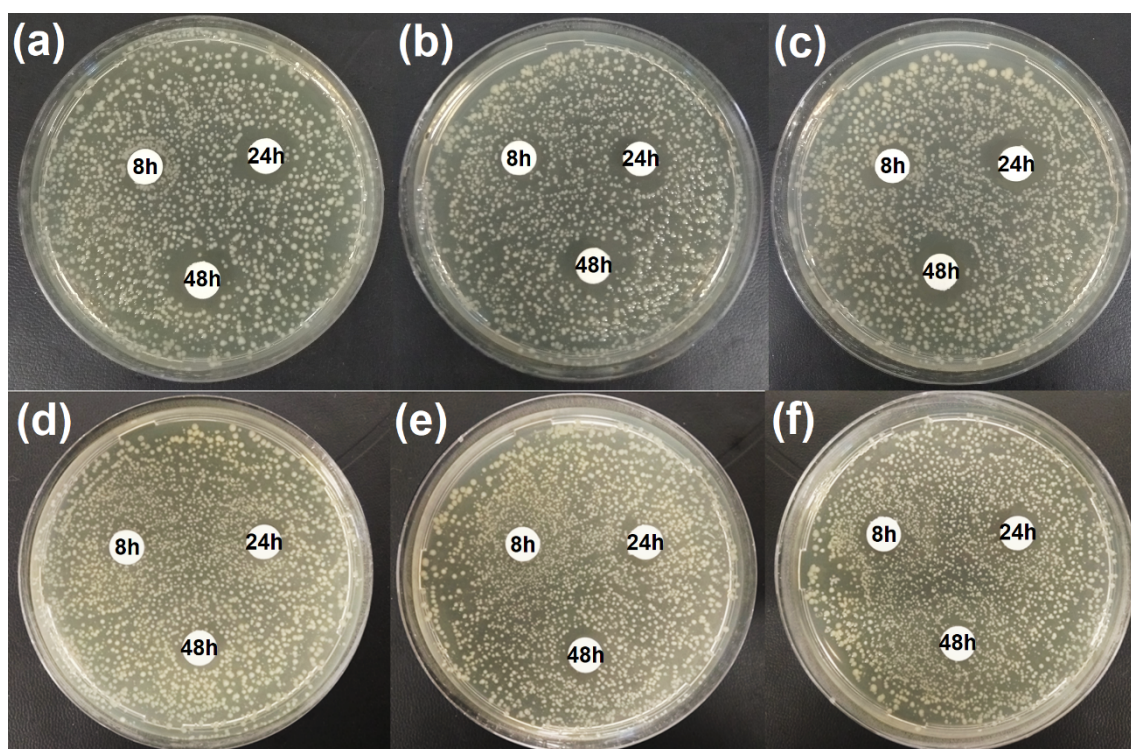
En el estudio comparativo de los parámetros cinéticos de la cepa 26, se pudo observar que la producción de biomasa máxima y la velocidad de crecimiento fueron mayores a 37 °C en los medios de cultivos ajustados a pH inicial 5.0 y 6.0, estos resultados son coherentes porque corresponden a las condiciones óptimas de crecimiento de varias especies de *Lacticaseibacillus* (Kondybayev et al., 2022; Bongoa et al., 2023; Icalia Gann et al., 2024; Copeland et al., 2025).

Con respecto a la cepa 95, si bien su velocidad de crecimiento fue mayor a 37 °C en el medio de cultivo ajustado a pH inicial 7.0 y 5.0, en estas condiciones se registraron los valores de biomasa más bajos (tabla 4). En cambio, los cultivos crecidos a 15 °C en el medio ajustado a pH 5.0 y 6.0, presentaron los valores



máximos de biomasa, siendo  $M = 1.99 \times 10^8$  UFC/mL en el medio a pH inicial 5.0, y  $M = 1.51 \times 10^8$  UFC/mL en el medio ajustado a pH 6.0. Cabe mencionar que la cepa 95 es una cepa de bacteria ácido láctica no iniciadora (NSLAB) proveniente de queso. Las cepas NSLAB están bien adaptadas a las condiciones de bajo pH (5.2 - 5.8) del queso y el rango de temperatura en que se maduran (10 - 15 °C), esto podría explicar los datos obtenidos para la cepa 95 (Ciprovica y Mikelsone, 2011; Kołakowski et al., 2012; Reginensi et al., 2016; Nalepa et al., 2020).

La actividad anticlostridial de los extractos concentrados provenientes de los cultivos bacterianos a las 8, 24 y 48 h de crecimiento en las condiciones experimentales consideradas, fue analizada mediante ensayo de difusión en discos en agar RCM (figura 3). Los halos de inhibición producidos por los extractos concentrados fueron evaluados cualitativamente (tablas 5 y 6) para determinar las condiciones de temperatura y pH asociadas a la mayor actividad inhibitoria.



**Figura 3:** Actividad anticlostridial de extractos concentrados correspondientes a las 8, 24 y 48 h de crecimiento de las cepas 26 (a - c) y 95 (d - f) en caldo MRS con lactosa 2% y extracto de levadura 1%, en las condiciones: pH 5 a 15 °C (a), pH 5.0 a 20 °C (b), pH 5.0 a 37 °C (c), pH 5.0 a 20 °C (d), pH 6.0 a 20 °C (e) y pH 6.0 a 37 °C (f).

<b>Tabla 5:</b> Diámetro (cm) de los halos de inhibición producidos por extractos crudos obtenidos a las 8, 24 y 48 horas de crecimiento de la cepa 26 al cultivarla a 15, 20 y 37 °C y pH inicial 5.0, 6.0 y 7.0. La cepa indicadora de inhibición fue <i>C. tyrobutyricum</i> ATCC 25755.									
	pH 5.0			pH 6.0			pH 7.0		
	8 h	24 h	48 h	8 h	24 h	48 h	8 h	24 h	48 h
15 °C	-	++	+++	-	-	++	-	-	++
20 °C	+	+	++	-	-	+	-	-	+
37 °C	+	++	++	-	-	-	-	-	-
Diámetro de halo de inhibición: ≤1.2 cm: negativo (-) 1.3 - 1.5 cm: positivo (+) 1.6 - 1.8 cm: doble positivo (++) ≥1.8 cm: triple positivo (+++)									

<b>Tabla 6:</b> Diámetro (cm) de los halos de inhibición producidos por extractos crudos obtenidos a las 8, 24 y 48 horas de crecimiento de la cepa 95 al cultivarla a 15, 20 y 37 °C y pH inicial 5.0, 6.0 y 7.0. La cepa indicadora de inhibición fue <i>C. tyrobutyricum</i> ATCC 25755.									
	pH 5.0			pH 6.0			pH 7.0		
	8 h	24 h	48 h	8 h	24 h	48 h	8 h	24 h	48 h
15 °C	-	-	+	-	+	-	-	+	+
20 °C	+	-	++	-	++	+++	-	+	-
37 °C	-	+	+	+	+	+	-	+	-
Diámetro de halo de inhibición: ≤1.2 cm: negativo (-) 1.3 - 1.5 cm: positivo (+) 1.6 - 1.8 cm: doble positivo (++) ≥1.8 cm: triple positivo (+++)									

De acuerdo a los resultados obtenidos en la mayoría de las condiciones experimentales se determinó que la actividad anticlostridial fue más alta en los extractos concentrados obtenidos de los cultivos con 48 h de crecimiento, mientras que los extractos concentrados provenientes de los cultivos con 8 h de crecimiento, presentaron la menor actividad inhibitoria. Este resultado podría deberse a la acumulación de las bacteriocinas en el medio de cultivo, proceso que otros investigadores también han reportado (Guo et al., 2020; de Niederhäusern et al., 2020; Ren et al., 2022; Wei et al., 2022). Específicamente, la cepa 26 tuvo más actividad inhibitoria al ser cultivada a 15 °C en el medio ajustado a pH 5.0, mientras que la cepa 95 presentó mayor actividad anticlostridial al crecerla a 20 °C en el medio de cultivo a pH 6.0. Las condiciones de pH y temperatura mencionadas no corresponden a las consideradas óptimas para el crecimiento bacteriano. Sin embargo, varios trabajos científicos han

reportado bacteriocinas cuya producción es mayor fuera de esas condiciones (Abbasiliasi et al., 2017; Zhang et al., 2018; Sabo et al., 2019; Khromova et al., 2020). En base a todos los resultados obtenidos a lo largo del estudio, con el fin de estimular la producción de metabolitos anticlostridiales por las cepas 26 y 95, se decidió emplear caldo MRS base adicionado con lactosa 2% y extracto de levadura al 1%, ajustado a pH 5.0 a 15 °C para cultivar a la cepa 26, o ajustado a pH 6.0 a 20 °C para el cultivo de la cepa 95.

A lo largo de las distintas etapas del proceso de ajuste de las condiciones de cultivo de las cepas 26 y 95, se empleó el método de difusión en discos para evaluar la actividad bacteriocinogénica presente en los extractos concentrados. Sin embargo, varios factores pueden afectar el diámetro de los halos de inhibición producidos en la placa, lo que puede llevar a sobreestimar o subestimar la actividad anticlostridial existente. Algunos de estos factores son la velocidad de crecimiento, el estado fisiológico y la densidad celular del microorganismo indicador de inhibición, la difusión del compuesto antimicrobiano en el agar y los factores que la afectan, entre ellos el peso molecular, la carga iónica y la solubilidad del compuesto antimicrobiano, los componentes del medio de cultivo que pueden interactuar con el agente inhibitorio, así como la temperatura y la humedad a la que se incuban las placas, el pH y la viscosidad del medio de cultivo (Montserrat Peña Gomar, 2005; Ávila et al., 2014; Schumacher et al., 2018; Yaqub et al., 2023; Hossain, 2024).

En consideración a lo discutido previamente, los resultados obtenidos al aplicar el método de difusión en discos fueron interpretados cualitativamente. Con el fin de analizar la actividad anticlostridial en forma cuantitativa, se decidió emplear el método de microdiluciones para determinar los valores de MIC de los extractos concentrados provenientes de cultivos de las cepas 26 y 95 en las condiciones que estimulan la producción de bacteriocinas, y compararlos con los valores de MIC de extractos concentrados obtenidos a partir de las cepas cultivadas en caldo MRS sin modificar (tabla 7). En el apartado 1 del anexo I se presentan los gráficos de DO<sub>620 nm</sub> en función de las diluciones seriadas al medio de la cepa ATCC 25755 de *C. tyrobutyricum* empleada en el estudio.

<b>Tabla 7:</b> Valores de MIC (UA/mL) de extractos concentrados de las cepas 26 y 95 al cultivarlas durante 24 h en caldo MRS modificado y sin modificar.			
<b>Cepa 26</b>		<b>Cepa 95</b>	
<b>Caldo MRS modificado</b>	<b>Caldo MRS sin modificar*</b>	<b>Caldo MRS modificado</b>	<b>Caldo MRS sin modificar*</b>
1.67 UA/mL	3.33 UA/mL	0.83 UA/mL	1.67 UA/mL
*Ajustado a pH 6.5. Temperatura de crecimiento: 37 °C.			

En el análisis comparativo se pudo determinar que los extractos concentrados provenientes de las cepas 26 y 95 tuvieron valores de MIC más altos al cultivarlas en caldo MRS modificado, y por ende mayor actividad anticlostridial, en comparación a los registrados en los extractos concentrados obtenidos a partir de los cultivos realizados en caldo MRS sin modificar. Esto sugiere que la

concentración de bacteriocinas fue superior en los extractos concentrados al emplear el caldo MRS modificado. En base a estos datos, se puede considerar que las modificaciones de la composición del medio de cultivo, el pH y la temperatura de crecimiento, lograron incrementar la producción de bacteriocinas.

### 3.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de extractos concentrados de las cepas 26 y 95 de *Lacticaseibacillus*

Los valores de MIC de los extractos concentrados de las cepas 26 y 95 contra suspensiones de esporas ( $10^6$  esporas/mL) de las cepas 175.1, 193.5, 206.2 y 206.6 de *C. tyrobutyricum* provenientes de quesos afectados por hinchazón tardía por el método de microdiluciones y determinación de DO a 620 nm. En el punto 2 del anexo I se encuentran los gráficos de DO<sub>620 nm</sub> en función de las diluciones seriadas al medio consideradas en los ensayos de microdiluciones realizados. La tabla 8 presenta los valores de MIC de los extractos concentrados contra las cepas de *C. tyrobutyricum* consideradas en el estudio.

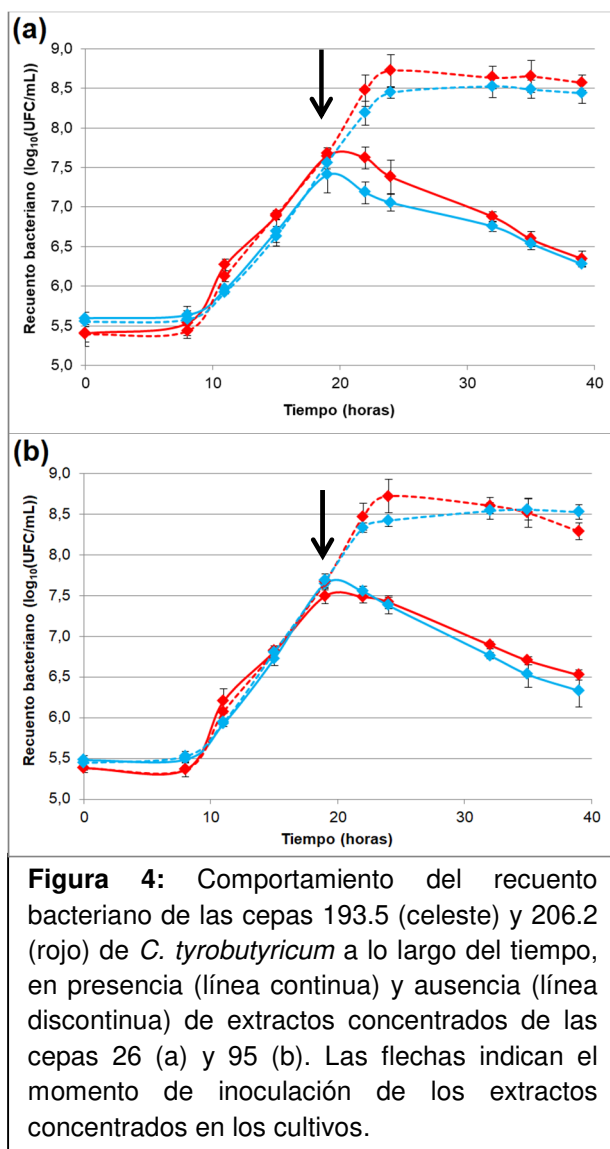
<b>Tabla 8:</b> Valores de MIC (UA/mL) de extractos concentrados de las cepas 26 y 95 de <i>Lacticaseibacillus</i> contra cepas de <i>C. tyrobutyricum</i> .		
<b>Cepa de <i>C. tyrobutyricum</i></b>	<b>Cepa 26 MIC (UA/mL)</b>	<b>Cepa 95 MIC (UA/mL)</b>
175.1	0.83	0.83
193.5	1.67	1.67
206.2	0.83	0.83
206.6	1.67	0.83

En la tabla 8, se observa que los compuestos anticlostidiales producidos por las cepas BAL presentaron valores de MIC diferentes para las distintas cepas de *Clostridium* evaluadas. Las variaciones detectadas en el valor de MIC de los extractos concentrados de ambas cepas de *Lacticaseibacillus*, pueden deberse a que las células vegetativas y/o esporas de distintas cepas de *C. tyrobutyricum* difieren en su grado de sensibilidad a los compuestos anticlostidiales de las cepas 26 y 95. Este resultado coincide con otros trabajos científicos que han determinado los valores de MIC de bacteriocinas contra distintas cepas de *C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes*, *C. butyricum*, *C. beijerinckii* y *C. perfringens*. Dichas investigaciones también han encontrado diferencias a nivel de cepas en el grado de resistencia intrínseca a las bacteriocinas estudiadas (Ávila et al., 2014; Garde et al., 2014; García-Vela et al., 2024).

Es importante mencionar que la cepa 193.5 resultó la más susceptible a ambos extractos concentrados (MIC: 1.67 UA/mL), mientras que las cepas 175.1 y 206.2 presentaron la menor sensibilidad (MIC: 0.83 UA/mL). De éstas se seleccionaron las cepas 193.5 y 206.2 para realizar el estudio de determinación del efecto bacteriostático o bactericida de los extractos concentrados.

### 3.3 Determinación del efecto antimicrobiano de los extractos concentrados (bacteriostático o bactericida)

La actividad anticlostridial producida por los extractos concentrados de las cepas 26 y 95 fue estudiada a lo largo del tiempo contra cultivos de las cepas 193.5 y 206.2 de *C. tyrobutyricum* para determinar si dichos extractos ejercen un efecto bacteriostático o bactericida. Los recuentos bacterianos de las cepas 193.5 y 206.2 a lo largo del tiempo fueron graficados en la figura 4 para determinar el tipo de actividad anticlostridial producido por cada extracto concentrado.



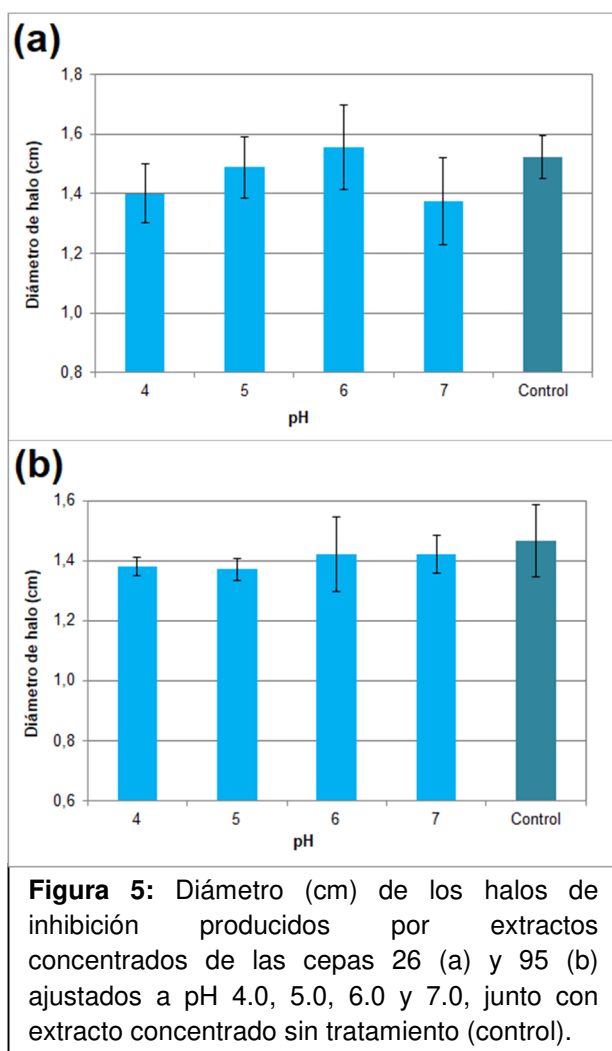
Como puede apreciarse en los gráficos, los extractos concentrados de las cepas 26 y 95 tuvieron un efecto bactericida contra las dos cepas clostridiales evaluadas. Los recuentos bacterianos de ambas cepas en los cultivos a tiempo final, 39 h, fueron comparados con los existentes a las 19 h, momento en que los viales fueron inoculados con los extractos concentrados. El extracto concentrado de la cepa 26, provocó una reducción de 1.30 y 1.12 unidades logarítmicas en los respectivos recuentos bacterianos de las cepas 193.5 y 206.2. En el caso del



extracto concentrado de la cepa 95, a las 39 h de cultivo de las cepas 193.5 y 206.2, se constató una reducción de 1.31 y 0.97 unidades logarítmicas en sus respectivos recuentos bacterianos.

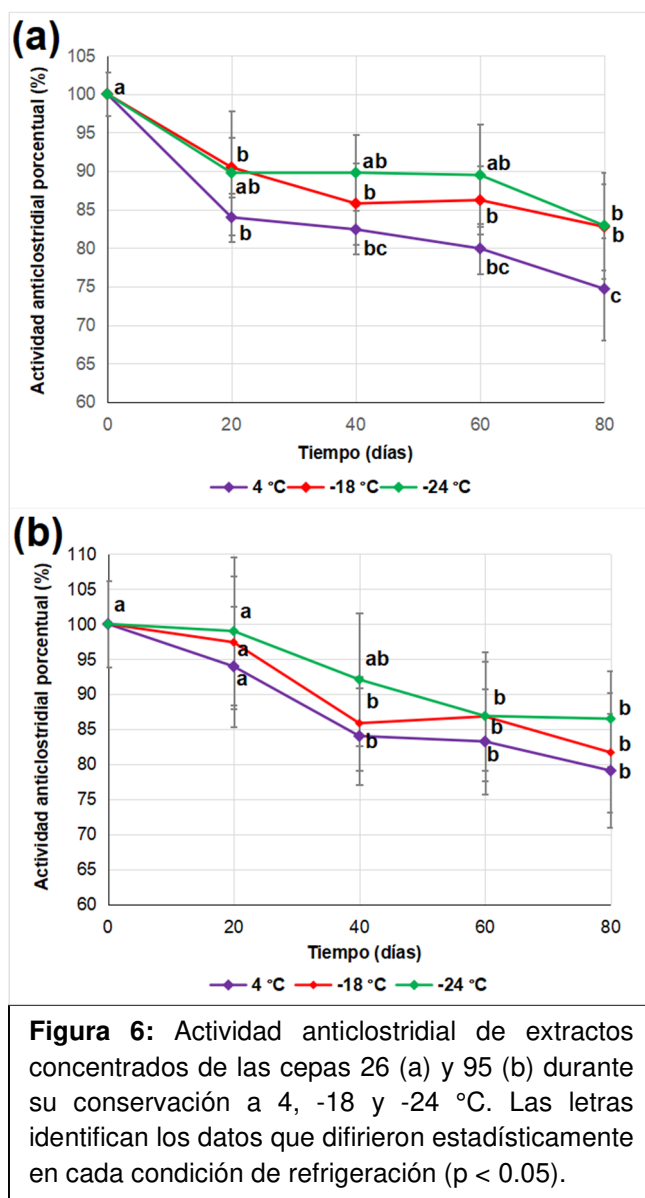
### 3.4 Efecto del pH y la temperatura de refrigeración en la estabilidad de extractos concentrados

Con el fin de estudiar el efecto del pH en la estabilidad de los compuestos anticlostridiales producidos por las cepas 26 y 95, se evaluó la actividad inhibitoria de los extractos concentrados de ambas cepas luego de someterlos a pH 4.0, 5.0, 6.0 y 7.0 por 5 h a 37 °C, mediante el método de difusión en discos. Asimismo, la actividad anticlostridial fue comparada con el extracto concentrado sin modificación de su pH (control). En el punto 3 del anexo I se muestran fotos de los ensayos de inhibición realizados en el estudio. Las figuras 5a y 5b comparan los diámetros promedios de los halos de inhibición obtenidos en los ensayos experimentales.



Para ambas cepas no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos realizados y el extracto concentrado sin modificación del pH

(control) ( $p > 0.05$ ). De acuerdo a esto, las condiciones de pH consideradas en el estudio no afectaron la estabilidad de las bacteriocinas presentes en los extractos concentrados. Es importante destacar el resultado del análisis porque en el proceso de elaboración de la mayoría de los quesos madurados, el pH de la leche que inicialmente es 6.6 - 6.8, disminuye hasta alcanzar un rango entre 5.2 - 5.8 en el queso al inicio de la maduración (Ciprovica y Mikelson, 2011; Kołakowski et al., 2012; Reginensi et al., 2016; Nalepa et al., 2020). Lo anterior hace suponer que, en la producción quesera este parámetro no debería incidir en forma negativa sobre la actividad anticlostridial de estos compuestos inhibidores.



En referencia al estudio de estabilidad de los extractos concentrados durante su almacenamiento bajo refrigeración, la actividad anticlostridial de éstos fue analizada por el método de difusión en discos a los 0, 20, 40, 60 y 80 días de refrigeración. En el anexo I se presentan fotos de los ensayos experimentales realizados. El diámetro de los halos de inhibición producidos en las placas fue

representado gráficamente en la figura 6 como porcentaje de actividad anticlostridial respecto a la existente en el control (día 0).

A cada temperatura de almacenamiento, los datos obtenidos en los distintos tiempos de análisis fueron comparados estadísticamente entre sí para evaluar el grado de estabilidad a lo largo del período de conservación. Los datos que difirieron estadísticamente se indican en los gráficos de la figura 6. Se observó una reducción progresiva de la actividad anticlostridial de los extractos concentrados de ambas cepas durante el período de almacenamiento a las tres temperaturas consideradas en el estudio. En el caso de la cepa 26, a partir de los 20 días de conservación de los extractos a 4 y -18 °C se detectó una pérdida significativa de la actividad inhibitoria respecto a la existente en el día 0 (control). En cambio, la actividad anticlostridial del extracto concentrado conservado a -24 °C sólo difirió de la detectada en el control a los 80 días de almacenamiento ( $p < 0.05$ ). La pérdida de actividad inhibitoria en los extractos concentrados de la cepa 26 al final del período de conservación a 4, -18 y -24 °C fue 25.31, 17.25 y 17.08 %, respectivamente.

Con respecto a la cepa 95, se determinó que la pérdida de actividad inhibitoria fue significativa a partir de los 40 días de almacenamiento a 4 y -18 °C, mientras que a -24 °C la disminución de la actividad anticlostridial resultó significativa a partir de los 60 días de conservación ( $p < 0.05$ ). La reducción de la actividad inhibitoria de los extractos concentrados al finalizar el período de refrigeración fue 20.92, 18.32 y 13.51 % a 4, -18 y -24 °C, respectivamente.

Por otro lado, los datos obtenidos en cada tiempo de análisis a las tres temperaturas de refrigeración fueron comparados estadísticamente entre sí, para determinar si la estabilidad de los extractos concentrados difirió según la temperatura en que fueron conservados. El análisis mencionado en el caso de la cepa 26 no detectó diferencias significativas entre las tres temperaturas consideradas ( $p > 0.05$ ), en consecuencia, las condiciones de refrigeración aplicadas en el estudio no parecen diferir en su impacto en la estabilidad de los compuestos anticlostridiales producidos por *Lacticaseibacillus* 26. Sin embargo, teniendo en cuenta que a -18 y -24 °C los extractos concentrados de la cepa 26 presentaron menor pérdida de actividad inhibitoria con respecto al extracto almacenado a 4 °C, se considera que dichas temperaturas de almacenamiento serían las más adecuadas para conservar los metabolitos anticlostridiales de *Lacticaseibacillus* 26.

En cuanto al efecto de la temperatura en la actividad anticlostridial de los extractos concentrados de *Lacticaseibacillus* 95 en los distintos tiempos de almacenamiento, sólo se detectaron diferencias significativas entre los datos correspondientes a 4 y -24 °C a los 40 y 80 días ( $p < 0.05$ ). En ambos períodos de tiempo la actividad anticlostridial fue mayor a -24 °C que a 4 °C. Los datos asociados al extracto concentrado almacenado a -18 °C no difirieron significativas respecto a los datos obtenidos a 4 y -24 °C a lo largo del período de análisis ( $p > 0.05$ ). De acuerdo a lo que se discutió previamente, la temperatura que resultaría más adecuada para conservar el extracto concentrado de *Lacticaseibacillus* 95 sería -24 °C.



Otros investigadores, que han evaluado la estabilidad de bacteriocinas producidas por *Lactocaseibacillus* y otros géneros de bacterias ácido lácticas han reportado que la actividad antimicrobiana de estos compuestos se conserva por más tiempo a temperaturas de congelación porque las reacciones enzimáticas y otros procesos de degradación se detienen o enlentecen (Ma et al., 2020; Zangeneh et al., 2020; Zhao et al., 2020; Afrin et al., 2021; Melia et al., 2021; Peng et al., 2023). Cabe mencionar que la estabilidad de las bacteriocinas depende en parte de su composición aminoacídica y su conformación, siendo generalmente más estable cuando presentan estructura globular o contiene hélices alfa anfipáticas (Funck et al., 2019; Zangeneh et al., 2020; Sukmawati et al., 2022; Guo et al., 2024). Otro factor a considerar es la naturaleza química del solvente o de la matriz en que se encuentran, la presencia de aditivos y el grado de solubilidad de la bacteriocina (da Costa et al., 2019).

#### 4. Conclusión

En este capítulo se discutieron los estudios realizados para determinar las condiciones de pH y temperatura, así como las fuentes de carbono y nitrógeno del medio de cultivo que fueron más adecuados para estimular la actividad bacteriocinogénica de las cepas 26 y 95 en forma *in vitro*. Los extractos concentrados producidos en dichas condiciones fueron caracterizados desde el punto de vista fisicoquímico y microbiológico. Los estudios de microbiológicos indicaron que los compuestos anticlostridiales producidos por las cepas 26 y 95 tienen un efecto bactericida, y que diferentes cepas de *C. tyrobutyricum* provenientes de quesos con defecto de hinchazón tardía, mostraron una sensibilidad diferente frente a las mismas. Con respecto a las propiedades fisicoquímicas, se evaluó el efecto del pH y la temperatura de refrigeración en la estabilidad de los compuestos con actividad anticlostridial. La modificación del pH en el rango de 4.0 a 7.0 no afecta la actividad inhibitoria de las bacteriocinas de las cepas 26 y 95, lo que sugiere su compatibilidad con el desarrollo de acidez que ocurre en el proceso de elaboración de quesos duros y semiduros. Además, los extractos concentrados de ambas cepas podrían ser almacenados a -18 y -24 °C, con pérdidas mínimas en su actividad inhibitoria.

## 5. Bibliografía

Abanoz, H.S., & Kunduhoglu, B. (2018). Antimicrobial activity of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* KT11 against some pathogens and antibiotic-resistant bacteria. Korean Journal of Food Science of Animal Resources, Vol. 38, No. 5, 1064 - 1079. DOI: <https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.e40>

Abbasiliasi, S., Tan, J.S., Tengku Ibrahim, T.A., Bashokouh, F., Ramakrishnan, N.R., Mustafa, S., & Ariff, A.B. (2017). Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review. RSC Advances, Vol. 7, No. 47, 29395 - 29420. DOI: <https://doi.org/10.1039/c6ra24579j>

Abd-Elhamed, E.Y., El-Bassiony, T.A.E.-R., Elsherif, W.M., & Shaker, E.M. (2024). Enhancing Ras cheese safety: antifungal effects of Nisin and its nanoparticles against *Aspergillus flavus*. BMC Veterinary Research, Vol. 20, No. 1. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-024-04323-1>

Afrin, S., Hoque, M.A., Sarker, A.K., Satter, M.A., & Bhuiyan, M.N.I. (2021). Characterization and profiling of bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria from cheese samples. Access Microbiology, Vol. 3, No. 6, 000234. DOI: <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000234>

Ahn, H., & Lee, H.J. (2025). Investigation of bacteriocin production ability of *Pediococcus acidilactici* JM01 and probiotic properties isolated from Tarak, a conventional Korean fermented milk. Food Science & Nutrition, Vol. 13, No. 9, e71003. DOI: <https://doi.org/10.1002/fsn3.71003>

Al-Hashedi, S.A., Al-Helali, M. F., Al-Zoreky, N.S., Al-Dalali, S.S., Al-Hajj, N.Q., Algabri, N.A., El-Hack, M.E.A., Farag, M.R., & Alagawany, M. (2019). Antibacterial activity of *Enterococcus faecium* and *Propionibacterium* sp. against food-borne and pathogenic bacteria. Advances in Animal and Veterinary Sciences, Vol. 7, No. 12. DOI: <https://doi.org/10.17582/journal.aavs/2019/7.12.1093.1100>

Arakawa, K., Matsunaga, K., Takihiro, S., Moritoki, A., Ryuto, S., Kawai, Y., Masuda, T., & Miyamoto, T. (2015). *Lactobacillus gasseri* requires peptides, not proteins or free amino acids, for growth in milk. Journal of Dairy Science, Vol. 98, No. 3, 1593 - 1603. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8860>

Ávila, M., Garde, S., Medina, M., & Nuñez, M. (2005). Effect of milk inoculation with bacteriocin-producing lactic acid bacteria on a *Lactobacillus helveticus* adjunct cheese culture. Journal of Food Protection, Vol. 68, No. 5, 1026 - 1033. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-68.5.1026>

Ávila, M., Gómez-Torres, N., Gaya, P., & Garde, S. (2020). Effect of a Nisin-producing lactococcal starter on the late blowing defect of cheese caused by *Clostridium tyrobutyricum*. International Journal of Food Science and Technology, Vol. 55, No. 10, 3343 - 3349. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.14598>

Ávila, M., Gómez-Torres, N., Hernández, M., & Garde, S. (2014). Inhibitory activity of Reuterin, Nisin, Lysozyme and Nitrite against vegetative cells and spores of dairy-related *Clostridium* species. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 172, 70 - 75. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.002>

Ayad, A.A., Gad El-Rab, D.A., Ibrahim, S.A., & Williams, L.L. (2020). Nitrogen sources effect on *Lactobacillus reuteri* growth and performance cultivated in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) by-products. *Fermentation*, Vol. 6, No. 3, 64. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation6030064>

Bengoa, A.A., Dueñas, M.T., Prieto, A., Garrote, G.L., & Abraham, A.G. (2023). Exopolysaccharide-producing *Lactocaseibacillus paracasei* strains isolated from kefir as starter for functional dairy products. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 14, 1110177. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1110177>

Beshkova, D., & Frengova, G. (2012). Bacteriocins from lactic acid bacteria: microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Engineering in Life Sciences*, Vol. 12, No. 4, 419 - 432. DOI: <https://doi.org/10.1002/elsc.201100127>

Brändle, J., Heinzle, L., Fraberger, V., Berta, J., Zitz, U., Schinkinger, M., Stocker, W., Kneifel, W., & Domig, K.J. (2018). Novel approach to enumerate clostridial endospores in milk. *Food Control*, Vol. 85, 318 - 326. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.017>

Castilho, N.P.A., Colombo, M., de Oliveira, L.L., Todorov, S.D., & Nero, L.A. (2019). *Lactobacillus curvatus* UFV-NPAC1 and other lactic acid bacteria isolated from calabresa, a fermented meat product, present high bacteriocinogenic activity against *Listeria monocytogenes*. *BMC Microbiology*, Vol. 19, No. 1, 63. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1436-4>

Chang, C.P., & Liew, S.L. (2012). Growth medium optimization for biomass production of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. *Journal of Food Biochemistry*, Vol. 37, No. 5, 536 - 543. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfbc.12004>

Ciprovica, I., & Mikelson, A. (2011). The influence of ripening temperature on diversity of non-starter lactic acid bacteria in semi-hard cheeses. *Romanian Biotechnological Letters*, Vol. 16, No. 6, Supplement, 155 - 162.

Copeland, H.M., Maye, S., MacLeod, G., Brabazon, D., Loscher, C., & Freeland, B. (2025). Statistical optimisation and analysis of biomass and exopolysaccharide production by *Lactocaseibacillus rhamnosus* LRH30. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 41, No. 58. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-025-04273-2>

Darbandi, A., Asadi, A., Mahdizade Ari, M., Ohadi, E., Talebi, M., Halaj Zadeh, M., Darb Emamie, A., Ghanavati, R., & Kakanj, M. (2021). Bacteriocins:

properties and potential use as antimicrobials. Journal of Clinical Laboratory Analysis, Vol. 36, No. 1. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcla.24093>

da Costa, R.J., Voloski, F.L.S., Mondadori, R.G., Duval, E.H., & Fiorentini, Â.M. (2019). Preservation of meat products with bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from meat. Journal of Food Quality, Vol. 2019, 4726510. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/4726510>

de Farias, F.M., Soria, M.C., O'Connor, P.M., Huang, X., Buttner, C., Kamilar, E., Deliephan, A., Hill, D., Fursenko, O., Wiese, J., Draper, L., Stanton, C., Hill, C., & Ross, R.P. (2025). *Leuconostoc lactis* strain APC 3969 produces a new variant of cyclic bacteriocin leucocyclicin Q and displays potent anti-*Clostridium perfringens* activity. Scientific Reports, Vol. 15, No. 1, 6372. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-89450-x>

de Niederhäusern, S., Camellini, S., Sabia, C., Iseppi, R., Bondi, M., & Messi, P. (2020). Antilisterial activity of bacteriocins produced by lactic bacteria isolated from dairy products. Foods, Vol. 9, No. 12, 1757. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods9121757>

Eyahmalay, J., Elsayed, E.A., Dailin, D.J., Ramli, S., Sayyed, R.Z., & El-Enshasy, H.A. (2020). Statistical optimization approaches for high cell biomass production of *Lactobacillus casei*. Journal of Scientific & Industrial Research, Vol. 79, No. 3, 216 - 221. DOI: <https://doi.org/10.56042/jsir.v79i3.68645>

Fatima, D., & Mebrouk, K. (2013). Characterization and determination of the factors affecting anti-listeria bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* isolated from dairy milk products. African Journal of Food Science, Vol. 7, No. 2, 35 - 44. DOI: <https://doi.org/10.5897/ajfs12.037>

Funck, G.D., de Lima Marques, J., da Silva Dannenberg, G., dos Santos Cruxen, C.E., Sehn, C.P., Prigol, M., Silva, M.R.P., da Silva, W.P., & Fiorentini, Â.M. (2019). Characterization, toxicity, and optimization for the growth and production of bacteriocin-like substances by *Lactobacillus curvatus*. Probiotics and Antimicrobial Proteins, Vol. 12, No. 1, 91 - 101. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09531-y>

Furtado, D.N., Todorov, S.D., Landgraf, M., Destro, M.T., & Franco, B.D.G.M. (2014). Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DF04Mi isolated from goat milk: characterization of the bacteriocin. Brazilian Journal of Microbiology, Vol. 45, No. 5, 1541 - 1550. DOI: <https://doi.org/10.1590/s1517-83822014000400052>

Fuso, A., Bancalari, E., Castellone, V., Caligiani, A., Gatti, M., & Bottari, B. (2023). Feeding lactic acid bacteria with different sugars: effect on exopolysaccharides (EPS) production and their molecular characteristics. Foods, Vol. 12, No. 1, 215. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12010215>

García-Vela, S., Guay, L.-D., Rahman, M.R.T., Biron, E., Torres, C., & Fliss, I. (2024). Antimicrobial activity of synthetic Enterocins A, B, P, SEK4, and L50,

alone and in combinations, against *Clostridium perfringens*. International Journal of Molecular Sciences, Vol. 25, No. 3, 1597. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms25031597>

Garde, S., Gómez-Torres, N., Hernández, M., & Ávila, M. (2014). Susceptibility of *Clostridium perfringens* to antimicrobials produced by lactic acid bacteria: Reuterin and Nisin. Food Control, Vol. 44, 22 - 25. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.034>

Garzón, K., Ortega, C., & Tenea, G.N. (2017). Characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from native fruits of Ecuadorian Amazon. Polish Journal of Microbiology, Vol. 66, No. 4, 473 - 481. DOI: <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.7037>

Ge, J., Kang, J., & Ping, W. (2019). Effect of acetic acid on bacteriocin production by Gram-positive. Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol. 29, No. 9, 1341 - 1348. DOI: <https://doi.org/10.4014/jmb.1905.05060>

Golneshin, A., Gor, M.-C., Williamson, N., Vezina, B., Van, T.T.H., May, B.K., & Smith, A.T. (2020). Discovery and characterisation of circular bacteriocin plantacyclin B21AG from *Lactiplantibacillus plantarum* B21. Heliyon, Vol. 6, No. 8, e04715. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04715>

Guo, X., Bai, X., Zheng, Z., Qiu, Z., Qiao, X., & Qiao, Y. (2025). Optimization of culture conditions for bacteriocin production by *Pediococcus acidilactici* CCFM18 and characterization of its biological properties. Fermentation, Vol. 11, No. 8, 470. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation11080470>

Guo, X., Chen, J., Sun, H., Luo, L., Gu, Y., Yi, Y., Wang, X., Shan, Y., Liu, B., Zhou, Y., & Lü, X. (2020). Mining, heterologous expression, purification and characterization of 14 novel bacteriocins from *Lactobacillus rhamnosus* LS-8. International Journal of Biological Macromolecules, Vol. 164, 2162 - 2176. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.067>

Gutiérrez-Córtés, C., Suarez, H., Buitrago, G., Nero, L.A., & Todorov, S.D. (2018). Characterization of bacteriocins produced by strains of *Pediococcus pentosaceus* isolated from Minas cheese. Annals of Microbiology, Vol. 68, No. 6, 383 - 398. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1345-z>

Hassan, H., St-Gelais, D., Gomaa, A., & Fliss, I. (2021). Impact of Nisin and Nisin-producing *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* on *Clostridium tyrobutyricum* and bacterial ecosystem of cheese matrices. Foods, Vol. 10, No. 4, 898. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10040898>

Hassan, M.U., Nayab, H., Rehman, T.U., Williamson, M.P., Haq, K.U., Shafi, N., & Shafique, F. (2020). Characterisation of bacteriocins produced by *Lactobacillus* spp. isolated from the traditional Pakistani yoghurt and their antimicrobial activity against common foodborne pathogens. BioMed Research International, Vol. 2020, No. 1. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/8281623>

Hayek, S.A., Gyawali, R., Aljaloud, S.O., Krastanov, A., & Ibrahim, S.A. (2019). Cultivation media for lactic acid bacteria used in dairy products. *Journal of Dairy Research*, Vol. 86, No. 4, 490 - 502. DOI: <https://doi.org/10.1017/s002202991900075x>

Hellal, A., Amrouche, L., Ferhat, Z., & Laraba, F. (2011). Characterization of bacteriocin from *Lactococcus* isolated from traditional Algerian dairy products. *Annals of Microbiology*, Vol. 62, No. 1, 177 - 185. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0244-3>

Hossain, T.J. (2024). Methods for screening and evaluation of antimicrobial activity: A review of protocols, advantages, and limitations. *European Journal of Microbiology and Immunology*, Vol. 14, No. 2, 97 - 115. DOI: <https://doi.org/10.1556/1886.2024.00035>

Icalia Gann, P.J., Fabia, J.Z.P., Pagurayan, A.G.B., Agcaoili, M.J.T., Pascual, R.J.J., Baranda, S. M., Racho, A.J.J., Olivar, M.P., Cariaga, J.F., Domingo, A., Bucuo, D.S., & Agrupis, S.C. (2024). Carbohydrate hydrolytic activity, antibiotic resistance and stress tolerance of *Lactocaseibacillus paracasei* BCRC-16100 and *Lactocaseibacillus paracasei* ZFM54 for probiotics using genomic and biochemical approaches. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, Vol. 18, No. 4, 2806 - 2822. DOI: <https://doi.org/10.22207/JPAM.18.4.53>

Iyapparaj, P., Maruthiah, T., Ramasubburayan, R., Prakash, S., Kumar, C., Immanuel, G., & Palavesam, A. (2013). Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus* sp. MSU3IR against shrimp bacterial pathogens. *Aquatic Biosystems*, Vol. 9, No. 1, 12. DOI: <https://doi.org/10.1186/2046-9063-9-12>

Jawan, R., Abbasiliasi, S., Tan, J.S., Halim, M., Mustafa, S., Lee, B.H., Kwa, J.S., & Ariff, A.B. (2021). Extractive fermentation for recovery of bacteriocin-like inhibitory substances derived from *Lactococcus lactis* Gh1 using PEG2000/Dextran T500 aqueous two-phase system. *Fermentation*, Vol. 7, No. 4, 257. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation7040257>

Jones, R.J., Hussein, H.M., Zagorec, M., Brightwell, G., & Tagg, J.R. (2008). Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiology*, Vol. 25, No. 2, 228 - 234. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.11.001>

Kaškonienė, V., Stankevičius, M., Bimbraitė-Survilienė, K., Naujokaitytė, G., Šernienė, L., Mulkytė, K., Malakauskas, M., & Maruška, A. (2017). Current state of purification, isolation and analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 101, No. 4, 1323 - 1335. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8088-9>

Kaur, R., & Kumar Tiwari, S. (2017). Optimization of culture conditions for bacteriocin production by soil isolates *Pediococcus pentosaceus* LB44 and *Weissella confusa* LM85. *International Journal of Infection*, Vol. 4, No. 3, e15842. DOI: <https://doi.org/10.5812/iji.15842>



Khromova, N., Panfilov, V., Marinicheva, E., Epishkina, J., & Shakir, I. (2020). A study on industrial strains of lactic acid bacteria producing bacteriocins. 20th International multidisciplinary scientific geoconference proceedings SGEM 2020. Nano, bio, green and space: technologies for sustainable future, Vol. 20, 151 - 158. DOI: <https://doi.org/10.5593/sgem2020/6.1/s25.020>

Kim, J.-H., Lee, E.-S., Kim, B.-M., Ham, J.-S., & Oh, M.-H. (2023). Simple purification and antimicrobial properties of bacteriocin-like inhibitory substance from *Bacillus* species for the biopreservation of cheese. Foods, Vol. 13, No. 1, 10. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods13010010>

Kołakowski, P., Podolak, R., & Kowalska, M. (2012). Microbial profile of Gouda cheese during ripening in two independent chambers - a short report. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, Vol. 62, No. 3, 179 - 184. DOI: <https://doi.org/10.2478/v10222-012-0051-y>

Kondybayev, A., Konuspayeva, G., Strub, C., Loiseau, G., Mestres, C., Grabulos, J., Manzano, M., & Achir, N. (2022). Growth and metabolism of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus kefir* isolated from Qymyz, a traditional fermented central Asian beverage. Fermentation, Vol. 8, 367. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation8080367>

Lahiri, D., Nag, M., Dutta, B., Sarkar, T., Pati, S., Basu, D., Abdul Kari, Z., Wei, L.S., Smaoui, S., Wen Goh, K., & Ray, R.R. (2022). Bacteriocin: a natural approach for food safety and food security. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, Vol. 10, 1005918. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1005918>

Lim, S.-M., & Im, D.-S. (2009). Screening and characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from fermented foods. Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol. 19, No. 2, 178 - 186. DOI: <https://doi.org/10.4014/jmb.0804.269>

Ma, J., Yu, W., Hou, J., Han, X., Shao, H., & Liu, Y. (2020). Characterization and production optimization of a broad-spectrum bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* KLDS 1.0338 and its application in soybean milk biopreservation. International Journal of Food Properties, Vol. 23, No. 1, 677 - 692. DOI: <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1751656>

Macedo, R.E.F., Luciano, F.B., Cordeiro, R.P., & Udenigwe, C.C. (2017). Sausages and other fermented meat products (Chapter 16). In B. Speranza, A. Bevilacqua, M.R. Corbo, & M. Sinigaglia (Eds.), Starter cultures in food production (1st. ed., pp. 324 - 354). John Wiley & Sons, Ltd. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781118933794.ch16>

Madrigal Chávez, R. (2023). Identificación y caracterización de la actividad biológica de los péptidos antimicrobianos sintetizados durante la fermentación sumergida de *Bacillus subtilis*. [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Querétaro]. Repositorio Institucional DGBSDI-UAQ. <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/9935>

- Malini, M., & Savitha, J. (2015). Heat stable bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* isolated from locally available cheese: an *in vitro* study. E3 Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research, Vol. 3, No. 2, 28 - 41.
- Man, L.-L., & Xiang, D.-J. (2019). Characterization of a broad spectrum bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* MXG-68 from inner Mongolian traditional fermented koumiss. Folia Microbiologica, Vol. 64, No. 6, 821 - 834. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00697-0>
- Matamoros, S., Pilet, M.F., Gigout, F., Prévost, H., & Leroi, F. (2009). Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. Food Microbiology, Vol. 26, No. 6, 638 - 644. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.04.011>
- Melia, S., Juliyarsi, I., Kurnia, Y.F., Pratama, Y.E., & Pratama, D.R. (2021). Characteristics of antibacterial activity stability of crude bacteriocin *Pediococcus acidilactici* BK01. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Vol. 782, No. 3, 032074. DOI: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/782/3/032074>
- Mohamed, W.F., Khalil, K.M.A., Abu Shady, H.M., & Elnabi Sayed, H.A. (2016). Activity range determination and optimization of various environmental conditions for bacteriocin production by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum*. The Egyptian Journal of Experimental Biology (Botany), Vol. 12, No. 1, 53 - 66.
- Monserat Peña Gomar, G.M.A. (2005). Uso de suero lácteo para la producción de bacteriocinas por *Lactococcus lactis* UQ2 a nivel de biorreactor. [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Querétaro]. Repositorio Institucional DGBSDI-UAQ. <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/5530>
- Nalepa, B., Ciesielski, S., & Aljewicz, M. (2020). The microbiota of Edam cheeses determined by cultivation and high-throughput sequencing of the 16S rRNA amplicon. Applied Sciences, Vol. 10, No. 12, 4063. DOI: <https://doi.org/10.3390/app10124063>
- Parlindungan, E., Dekiwadia, C., & Jones, O.A.H. (2021). Factors that influence growth and bacteriocin production in *Lactiplantibacillus plantarum* B21. Process Biochemistry, Vol. 107, 18 - 26. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.05.009>
- Peng, Z., Xu, X., Fan, P., Qiao, B., Xie, M., Huang, T., & Xiong, T. (2023). Identification and characterization of a novel pH and heat stable bacteriocin-like substance lactococcin 036019 with food preserving potential. Food Control, Vol. 148, 109682. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109682>
- Rahmadana, S.T., Astuty, E., & Angkejaya, O.W. (2024). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from Sago wastewater as antibacterial. Jurnal Ilmiah Kedokteran Wijaya Kusuma, Vol. 13, No. 1, 15. DOI: <https://doi.org/10.30742/jikw.v13i1.3022>



Ramão Contessa, C., Vieira da Rosa, J., Texeira de Ávila, M., Silveira da Rosa, G., Costa Moraes, C., & Fernandes de Medeiros Burkert, J. (2024). Chemical and biotechnological processes employed as emerging technologies for the production and stability of bacteriocins. *Processes*, Vol. 13, No. 1, 44. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr13010044>

Reginensi, S.M., Olivera, J.A., Bermúdez, J., & González, M.J. (2016). *Lactobacillus* in the dairy industry: from natural diversity to biopreservation resources (Chapter 4). In S. Castro-Sowinski (Ed.), *Microbial models: from environmental to industrial sustainability. Microorganisms for sustainability* (Vol. 1, pp. 57 - 81). Springer, Singapore. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-981-10-2555-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-10-2555-6_4)

Ren, S., Yuan, X., Liu, F., Fang, F., Iqbal, H.M.N., Zahran, S.A., & Bilal, M. (2022). Bacteriocin from *Lactocaseibacillus rhamnosus* sp. A5: isolation, purification, characterization, and antibacterial evaluation for sustainable food processing. *Sustainability*, Vol. 14, No. 15, 9571. DOI: <https://doi.org/10.3390/su14159571>

Reyes-Castillo, P.A., Esquivel-Campos, A.L., Torres-Maravilla, E., Zúñiga-León, E., Mendoza-Pérez, F., González-Vázquez, R., Córdova-Espinoza, M.G., Gutiérrez-Nava, M.A., González-Vázquez, R., & Mayorga-Reyes, L. (2025). Hypoglycemic, antioxidant activities, and probiotic characteristics of *Lactocaseibacillus rhamnosus* LBUX2302 isolated from stool samples of neonates. *Life*, Vol. 15, No. 5, 804. DOI: <https://doi.org/10.3390/life15050804>

Sabo, S.S., Converti, A., Ichiwaki, S., & Oliveira, R.P.S. (2019). Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST16Pa in supplemented whey powder formulations. *Journal of Dairy Science*, Vol. 102, No. 1, 87 - 99. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14881>

Salman, M., Shahid, M., Sahar, T., Naheed, S., Mahmood-ur-Rahman, Arif, M., Iqbal, M., & Nazir, A. (2020). Development of regression model for bacteriocin production from local isolate of *Lactobacillus acidophilus* MS1 using Box-Behnken design. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Vol. 24, 101542. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101542>

Saraiva, M.A.F., Birri, D.J., Brede, D.A., Baracat-Pereira, M.C., de Queiroz, M.V., Nes, I.F., & de Moraes, C.A. (2020). Nisin Z production by wild strains of *Lactococcus lactis* isolated from Brazilian (Italian type) fermented sausage. *International Journal of Microbiology*, Article ID 9309628. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/9309628>

Schirru, S., Favaro, L., Mangia, N.P., Basaglia, M., Casella, S., Comunian, R., Fancello, F., de Melo Franco, B.D.G., de Souza Oliveira, P.R., & Todorov, S.D. (2014). Comparison of bacteriocins production from *Enterococcus faecium* strains in cheese whey and optimized commercial MRS medium. *Annals of Microbiology*, Vol. 64, No. 1, 321 - 331. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0667-0>

Schumacher, A., Vranken, T., Malhotra, A., Arts, J.J.C., & Habibovic, P. (2017). *In vitro* antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, Vol. 37, No. 2, 187 - 208. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3089-2>

Shahravy, A., Tabandeh, F., Bambai, B., Zamanizadeh, H.R., & Mizani, M. (2012). Optimization of probiotic *Lactobacillus casei* ATCC 334 production using date powder as carbon source. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, Vol. 18, No. 2, 273 - 282. DOI: <https://doi.org/10.2298/ciceq110709004s>

Sidooski, T., Brandelli, A., Bertoli, S.L., Krebs de Souza, C., & Fernandes de Carvalho, L. (2019). Physical and nutritional conditions for optimized production of bacteriocins by lactic acid bacteria - a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 59, No. 17, 2839 - 2849. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1474852>

Singh, B., Kumar, N., Yadav, A., Rohan, & Bhandari, K. (2025). Harnessing the power of bacteriocins: a comprehensive review on sources, mechanisms, and applications in food preservation and safety. *Current Microbiology*, Vol. 82, No. 4. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-025-04155-8>

Steier, V., Prigolovkin, L., Reiter, A., Neddermann, T., Wiechert, W., Reich, S.J., Riedel, C.U., & Oldiges, M. (2024). Automated workflow for characterization of bacteriocin production in natural producers *Lactococcus lactis* and *Latilactobacillus sakei*. *Microbial Cell Factories*, Vol. 23, No. 1. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02349-6>

Suissa, R., Oved, R., Maan, H., Hadad, U., Gilhar, O., Meijler, M.M., Koren, O., & Kolodkin-Gal, I. (2022). Context-dependent differences in the functional responses of Lactobacillaceae strains to fermentable sugars. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 13, 949932. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.949932>

Sukmawati, S., Sipriyadi, S., Yunita, M., Dewi, N.K., & Noya, E.D. (2022). Analysis of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from fermentation of rebon shrimp (*Acetes* sp.) in South Sorong, Indonesia as antibacterial agents. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, Vol. 23, No. 7. DOI: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d230763>

Sure, K.P., Kotnis, P.V., Bhagwat, P.K., Ranveer, R.C., Dandge, P.B., & Sahoo, A.K. (2016). Production and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus viridescence* (NICM 2167). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Vol. 59, e16150518. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016150518>

Syrokou, M.K., Stasinopoulou, P., Paramithiotis, S., Bosnea, L., Mataragas, M., Papadopoulos, G.K., Skandamis, P.N., & Drosinos, E.H. (2021). The effect of incubation temperature, substrate and initial pH value on plantaricin activity and the relative transcription of pln genes of six sourdough derived *Lactiplantibacillus*

*plantarum* strains. Fermentation, Vol. 7, No. 4, 320. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation7040320>

Veetil, V.N., & Chitra, A.V. (2022). Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* using Response Surface Methodology. Cellular and Molecular Biology, Vol. 68, No. 6, 105 - 110. DOI: <https://doi.org/10.14715/cmb/2022.68.6.17>

Wayah, S.B. and Philip, K. (2018). Characterization, yield optimization, scale up and biopreservative potential of fermencin SA715, a novel bacteriocin from *Lactobacillus fermentum* GA715 of goat milk origin. Microbial Cell Factories, Vol. 17, No. 1. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0972-1>

Wei, Y., Wang, J., Liu, Z., Pei, J., Brennan, C., & Abd El-Aty, A.M. (2022). Isolation and characterization of bacteriocin-producing *Lactocaseibacillus rhamnosus* XN2 from Yak yoghurt and its bacteriocin. Molecules, Vol. 27, No. 7, 2066. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27072066>

Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., & Walker, B. (2018). Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. AMB Express, Vol. 8, No. 10. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0536-0>

Yaqub, M., Balogun, A., & Bala, G. (2023). Antimicrobial susceptibility testing: a comprehensive review of current methods and challenges. Authorea, (preprint). DOI: <https://doi.org/10.22541/au.170370467.72246304/v1>

Yin, C., Qie, S., & Sang, N. (2015). Carbon source metabolism and its regulation in cancer cells. Critical ReviewsTM in Eukaryotic Gene Expression, Vol. 22, No. 1, 17 - 35. DOI: <https://doi.org/10.1615/critreveukargeneexpr.v22.i1.20>

Zangeneh, M., Khorrami, S., & Khaleghi, M. (2020). Bacteriostatic activity and partial characterization of the bacteriocin produced by *L. plantarum* sp. isolated from traditional sourdough. Food Science & Nutrition, Vol. 8, No. 11, 6023 - 6030. DOI: <https://doi.org/10.1002/fsn3.1890>

Zhang, P., Gänzle, M., & Yang, X. (2019a). Complementary antibacterial effects of bacteriocins and organic acids as revealed by comparative analysis of *Carnobacterium* spp. from meat. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 85, No. 20, e01227-19. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.01227-19>

Zhang, J., Yang, Y., Yang, H., Bu, Y., Yi, H., Zhang, L., Han, X., & Ai, L. (2018). Purification and partial characterization of bacteriocin Lac-B23, a novel bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* J23, isolated from Chinese traditional fermented milk. Frontiers in Microbiology, 9. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02165>

Zhang, J., Yi, H., Gong, P., Lin, K., Chen, S., Han, X., & Zhang, L. (2019b). Adsorption of plantaricin Q7 on montmorillonite and application in feedback regulation of plantaricin Q7 synthesis by *Lactobacillus plantarum* Q7. Engineering

in Life Sciences, Vol. 19, No. 1, 57 - 65. DOI: <https://doi.org/10.1002/elsc.201800086>

Zhang, T., Zhang, Y., Li, L., Jiang, X., Chen, Z., Zhao, F., & Yi, Y. (2022). Biosynthesis and production of class II bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. Fermentation, Vol. 8, No. 5, 217. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation8050217>

Zhao, R., Lu, Y., Ran, J., Li, G., Lei, S., Zhu, Y., & Xu, B. (2020). Purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus* zrx01. Food Bioscience, Vol. 38, 100754. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100754>

Zioga, E., Holdt, S.L., Gröndahl, F., & Bang-Berthelsen, C.H. (2025). Screening approaches and potential of isolated lactic acid bacteria for improving fermentation of *Saccharina latissima*. BMC Biotechnology, Vol. 25, No. 1. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12896-024-00926-6>

## Capítulo II. Caracterización tecnológica de las cepas 26 y 95 de *Lacticaseibacillus*

### 1. Introducción

La selección de cepas de bacterias ácido lácticas para su uso como cultivos iniciadores primarios o adjuntos en elaboraciones queseras, implica su caracterización tecnológica en forma *in vitro*. Posteriormente las cepas seleccionadas deben ser evaluadas en quesos producidos a escala piloto, no sólo para determinar si dichas cepas son efectivas en conferir la función por la cual son empleadas, sino también para asegurar su compatibilidad con las características fisicoquímicas y sensoriales del tipo de queso elaborado.

Independientemente de la funcionalidad buscada en las cepas BAL, es importante que éstas tengan un comportamiento estable y sean capaces de competir con la microflora del alimento, para poder predecir su desarrollo y las propiedades que aportarán al producto final (Kavitate et al., 2018; Çetin et al., 2024). Un aspecto básico de la caracterización tecnológica es estudiar la cinética de crecimiento en leche a distintas temperaturas, así como biomasa celular y la curva de acidificación desarrollada. También es importante evaluar el impacto del NaCl en las concentraciones empleadas en quesería, sobre el crecimiento bacteriano y las actividades biotecnológicas desarrolladas por las cepas, porque el NaCl modula la velocidad de crecimiento microbiano, así como la actividad de las enzimas liberadas en la masa del queso por las células bacterianas muertas (Kavitate et al., 2018; Çetin et al., 2024; Grujović et al., 2024).

Por otra parte, con el fin de no afectar el rendimiento quesero ni las propiedades fisicoquímicas del producto elaborado, deben realizarse estudios de co-cultivo para determinar el grado de compatibilidad entre las cepas analizadas y cultivos iniciadores comerciales de quesería (Geria y Caridi, 2014; Abarquero et al., 2024). Otra característica tecnológica a analizar es la producción de CO<sub>2</sub> por fermentación de carbohidratos. Las cepas BAL productoras de gas son responsables de la formación de ojos en los quesos que presentan esta característica (Faria Silva et al., 2023). Sin embargo, la presencia de ojos en los quesos de masa ciega es considerada un defecto, en consecuencia, para producir estas variedades deben emplearse cepas que no producen cantidades significativas de CO<sub>2</sub> (Reinheimer, 2022; Ritschard y Schuppler, 2024; Vencek Enriquez, 2025). Un aspecto relevante en la selección de cepas BAL para su uso en la producción de alimentos fermentados, es identificar y descartar aquellas cepas que contienen bacteriófagos integrados en el genoma bacteriano (profagos). La proliferación de bacteriófagos mediante el ciclo lítico conduce a la lisis bacteriana, esto puede llevar a la pérdida parcial o total del cultivo bacteriano. Debido a lo anterior, se prolonga el tiempo necesario para que ocurran las biotransformaciones de la matriz alimentaria, mientras que la calidad y el rendimiento quesero resultantes disminuyen (Coelho et al., 2022; Liu et al., 2022). Además de los aspectos tecnológicos analizados, debe tenerse en cuenta que la aplicación de cepas en alimentos requiere que éstas sean seguras para el ser humano, lo que implica descartar la presencia de genes de virulencia y resistencia a antibióticos (Coelho et al., 2022; Colautti et al., 2023, 2024).

Las cepas SLAB siempre son empleadas en la elaboración de productos lácteos fermentados por su velocidad rápida de acidificación, lo que hace posible disminuir el pH de la leche, con la consecuente floculación de las caseínas. Como la actividad acidificante puede variar a nivel de cepa, es necesario evaluar esta característica para seleccionar las variantes de acidificación rápida (Ribeiro et al., 2021; Nicosia et al., 2023). De acuerdo a Beresford et al. (2001), las cepas SLAB empleadas como cultivos iniciadores primarios deben acidificar la leche a un valor de pH por debajo de 5.3 luego de 6 h de crecimiento. Debe aclararse que más allá de la función mencionada, existen cepas SLAB que puede contribuir al perfil sensorial del producto elaborado a través de otros procesos metabólicos como son la proteólisis o la lipólisis. Además algunas cepas SLAB pueden ejercer actividad antimicrobiana contra microorganismos contaminantes del producto final, por lo que también contribuyen a su preservación (Taboada et al., 2014; Ruvalcaba-Gómez et al., 2021; Kaushik y Anand, 2025).

Con respecto a las cepas NSLAB, su incorporación en la producción de lácteos fermentados puede obedecer a tres posibles funciones: 1) mejorar características de sabor, aroma o textura por procesos bioquímicos distintos a la acidificación de la leche; 2) inhibir el desarrollo de microorganismos contaminantes en el producto final contribuyendo a su preservación durante el tiempo de vida útil; 3) desarrollar productos alimentarios que contengan cepas viables con efecto probiótico demostrado en la salud del ser humano, para aportar ese beneficio al consumidor (Carminati et al., 2016; Kavitate et al., 2018; Grujović et al., 2024).

El perfil sensorial de muchos tipos de quesos maduros se debe en gran parte al crecimiento de cepas NSLAB durante la etapa de maduración. La industria láctea realiza tratamientos físicos a la leche como la pasteurización, bacto-fugación y microfiltración para reducir la concentración de microorganismos contaminantes que ésta posee y producir alimentos inocuos y estables durante su tiempo de vida útil. Sin embargo, los procedimientos mencionados también eliminan parte de la microflora de NSLAB autóctonas de la leche (Coelho et al., 2022; Faria Silva et al., 2023; Abarquero et al., 2024; Sionek et al., 2024). Al existir una menor carga y diversidad de NSLAB viables en la leche tratada, el impacto de éstas en el producto final es menor, por lo que es necesario incorporar cepas NSLAB comerciales como cultivos iniciadores adjuntos en el proceso de elaboración. Dichas cepas contribuyen a las características sensoriales del queso mediante el desarrollo de actividad proteolítica, generando péptidos que aportan sabor amargo, y actividad lipolítica que libera ácidos grasos causantes del sabor rancio (Raj et al., 2021; Çetin et al., 2024; Kaushik y Anand, 2025). Asimismo, estos compuestos son catabolizados por las cepas NSLAB produciendo compuestos volátiles que contribuyen al sabor y aroma del producto. También existen cepas capaces de fermentar el citrato produciendo acetaldehído, acetoina y diacetilo, que mejoran las características mencionadas, además de CO<sub>2</sub> que es importante para el desarrollo de ojos en quesos y la producción de efervescencia en ciertas bebidas lácteas fermentadas (Faria Silva et al., 2023). Además algunas cepas NSLAB generan exopolisacáridos que mejoran la textura del producto y ayudan a incrementar el rendimiento productivo (Raj et al., 2021; Faria Silva et al., 2023; Aziz et al., 2024). Es importante evaluar dichas propiedades tecnológicas en las

cepas NSLAB no sólo en estudios *in vitro*, sino también en elaboraciones a escala piloto para determinar su impacto en los quesos producidos porque si ocurren en forma excesiva pueden provocar defectos sensoriales (Abarquero et al., 2024; Çetin et al., 2024; Kaushik y Anand, 2025).

Por otra parte, varios trabajos científicos han determinado que la diversidad de NSLAB, así como las especies predominantes en los quesos no sólo difieren según la variedad considerada y los parámetros fisicoquímicos del proceso de elaboración, sino también entre distintas plantas queseras y fluctúa a lo largo de la etapa de maduración (Dolci y Cocolin, 2018; Nikoloudaki, 2021; Barzideh et al., 2022; Martini et al., 2024). Debido a lo anterior, las características fisicoquímicas y el perfil organoléptico del producto final son el resultado de la actividad metabólica de las sucesivas cepas NSLAB que se vuelven predominantes en el transcurso de la etapa mencionada. En la producción quesera a nivel industrial se busca reducir la variabilidad entre distintas elaboraciones de una misma variedad (Dolci y Cocolin, 2018; Nikoloudaki, 2021; Bettera et al., 2023; Grujović et al., 2024). Como consecuencia de esto, con el fin de tener más control en las características finales, un criterio a considerar en la selección de cepas NSLAB a ser empleadas como cultivos iniciadores adjuntos, es su capacidad de predominar y ser estables a lo largo de la maduración (Dolci y Cocolin, 2018; Bettera et al., 2023; Grujović et al., 2024).

Existen cepas NSLAB que se adicionan en la elaboración de productos lácteos fermentados por su capacidad de prevenir el crecimiento de microorganismos contaminantes alterantes y/o patógenos. Estas cepas biopreservantes o bioprotectoras producen diversos metabolitos con acción antimicrobianos como son: ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, dióxido de carbono, acetaldehído, diacetilo, acetoína, ácidos grasos, etanol, exopolisacáridos, D-aminoácidos, compuestos fenólicos, reuterina y reuteriicina (Ajao et al., 2018; Özogul y Hamed, 2018; García-Cano et al., 2019; Putri et al., 2024; Muharram et al., 2025). La selección de las cepas para aplicarlas como bioprotectoras en los alimentos se basa en la efectividad de su actividad inhibitoria contra los microorganismos contaminantes usualmente presentes (Funck et al., 2019; Palavecino Prpich et al., 2021). Debe tenerse en cuenta que las características fisicoquímicas aplicadas en el proceso de producción y las existentes en la matriz del producto, así como la microflora asociada, pueden afectar el crecimiento de las cepas evaluadas, la síntesis de los compuestos inhibitorios y la estabilidad de éstos. También es importante estudiar el efecto de las cepas inhibitorias en las propiedades organolépticas del producto en que se desean incorporar (Taboada et al., 2014; Funck et al., 2019; Palavecino Prpich et al., 2021).

Todo lo que se describió anteriormente resalta la importancia de caracterizar tecnológicamente a una cepa microbiana para determinar su impacto y eficacia en productos alimentarios. Los estudios presentados en este capítulo tuvieron por objetivo determinar la compatibilidad de las cepas 26 y 95 con cepas BAL iniciadoras comerciales y el proceso de elaboración quesera.

## **2. Materias y métodos**

### **2.1 Compatibilidad de cepas BAL anticlostridiales con cepas BAL empleadas en fermentos comerciales**

Se analizó la compatibilidad de las cepas anticlostridiales 26 y 95 con cepas BAL provenientes de fermentos comerciales utilizados en quesería al ser confrontadas en dos diseños experimentales: 1) co-cultivo de las cepas en matraces Erlenmeyer conteniendo caldo MRS (De Man, Rogosa y Sharpe, 1960); 2) cultivo de las cepas enfrentadas en un sistema de dos compartimentos conteniendo caldo MRS y conectados por una membrana millipore de 0.22  $\mu\text{m}$  que permite la difusión de sus metabolitos, pero impide el contacto físico entre las cepas.

El estudio de confrontación de las cepas en co-cultivo se realizó en matraces Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 300 mL de caldo MRS. Todas las cepas fueron previamente cultivadas en caldo MRS por 24 h a 37 °C. Los cultivos bacterianos obtenidos se ajustaron a  $10^4$  UFC/mL por absorbancia a 620 nm. Cada matraz fue sembrado al 1 % con una cepa BAL anticlostridial y una cepa BAL comercial. En el análisis se incluyeron controles positivos de crecimiento de cada cepa evaluada que consistieron en cultivar dichas cepas en ausencia de confrontación. Todos los matraces se incubaron a 37 °C durante 48 h. A partir de los cultivos resultantes se realizaron diluciones decimales seriadas en solución salina fisiológica 0.85 % y éstas fueron sembradas por duplicado en placas del medio Homofermentativo-Heterofermentativo Diferencial (HHD) (Adnan et al., 2017; Blaiotta et al., 2018). Luego de incubar las placas sembradas en microaerofilia a 37 °C por 48 h, se determinaron los recuentos bacterianos de cada cepa. Los resultados obtenidos fueron analizados por el método estadístico One-way ANOVA ( $p < 0.05$ ).

En la segunda etapa del análisis de compatibilidad, se estudiaron las cinéticas de crecimiento de las cepas BAL comerciales y las cepas anticlostridiales 26 y 95, al cultivarlas en caldo MRS en condición de confrontación y ausencia de ésta (controles) en un sistema de dos compartimentos. Todas las cepas fueron previamente cultivadas en caldo MRS por 24 h a 37 °C. Los cultivos bacterianos obtenidos fueron ajustados por absorbancia a 620 nm y sembrados al 1 % en los compartimentos. El dispositivo se incubó a 37 °C durante 48 h. A las horas 0, 3, 5 y 7 se extrajeron muestras de cultivo de cada compartimento para determinar los recuentos bacterianos de las cepas evaluadas en placas de agar MRS luego de incubarlas en microaerofilia durante 48 h a 37 °C. En las horas mencionadas también se midió el pH en ambos compartimentos (Khosravi et al., 2014; Moutinho et al., 2017). Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente por One-way ANOVA ( $p < 0.05$ ).

### **2.2 Evaluación de la tolerancia de las cepas anticlostridiales al NaCl**

Se determinó el recuento de las cepas 26 y 95 al cultivarlas en concentraciones de NaCl de 0.0 - 2.5%. La finalidad del análisis fue determinar la tolerancia de estas cepas a los niveles de NaCl existentes en quesos duros y semiduros. Las cepas anticlostridiales fueron cultivadas en caldo MRS durante 24 h a 37 °C. A



partir de los cultivos obtenidos se sembraron tubos conteniendo caldo MRS y NaCl a las concentraciones finales 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 %. Los recuentos bacterianos existentes en los tubos con 24 h de crecimiento fueron determinados por recuento en placas de agar MRS y se compararon con el control (caldo MRS sin contenido de NaCl). Todos los ensayos se hicieron por duplicado (Chowdhury et al., 2012; Dugat-Bony et al., 2016).

### **2.3 Evaluación de la producción de gas por fermentación de carbohidratos**

Se evaluó la capacidad de las cepas 26 y 95 de producir gas (CO<sub>2</sub>) al fermentar los azúcares glucosa, lactosa, manitol, arabinosa y xilosa. El estudio tuvo por finalidad determinar la compatibilidad de estas cepas con la producción de quesos de masa ciega. La metodología consistió en preparar tubos con 8 mL de caldo MRS base adicionado al 1% con los carbohidratos mencionados por separado y una campana de Durham invertida para poder detectar la producción de gas. Las cepas se inocularon en los tubos al 1% a partir de cultivos bacterianos con 24 h de crecimiento en caldo MRS. La presencia de burbujas de gas en las campanas de Durham fue evaluada luego de incubar los tubos a 37 °C durante cinco días. Todos los ensayos se realizaron por duplicado (Mulaw et al., 2019; Marco et al., 2020).

### **2.4 Estudio de las cinéticas de crecimiento de las cepas 26 y 95 de *Lactocaseibacillus* en leche**

Se analizaron las cinéticas de crecimiento de las cepas 26 y 95, así como la actividad acidificante de éstas al cultivarlas en leche. La razón del estudio fue ajustar los tiempos de crecimientos de dichas cepas en la etapa de escalado necesaria para poderlas emplear como inóculos en elaboraciones queseras. Cada cepa fue cultivada durante 24 h en caldo MRS. El cultivo preparado fue inoculado al 1% en tres matraces Erlenmeyer conteniendo 250 mL de leche UHT estéril. A las 0, 3, 5, 8 y 10 horas de crecimiento, se determinó el recuento bacteriano en placas de agar MRS y el pH de la leche fue medido.

## **3. Resultados y discusión.**

### **3.1 Compatibilidad de cepas BAL anticlostridiales con cepas BAL empleadas en fermentos**

Se evaluó la compatibilidad de las cepas anticlostridiales 26 y 95 de *Lactocaseibacillus* al confrontarlas con diez cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) provenientes de fermentos queseros comerciales, pertenecientes a *Lactococcus lactis* (3/10), *Streptococcus thermophilus* (3/10), *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (2/10), *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* (1/10) y *Lactobacillus helveticus* (1/10). El estudio se realizó en dos etapas, la primera consistió en determinar los recuentos bacterianos (UFC/mL) de las cepas al crecerlas en caldo MRS en condición de co-cultivo y como cultivos puros (controles), dichos datos se presentan en las tablas 1 y 2.

**Tabla 1:** Recuentos bacterianos (UFC/mL) de la cepa 26 y cepas BAL comerciales en presencia de confrontación y ausencia de ésta (control).

Cepas BAL comerciales confrontadas	Cepa comercial en co-cultivo	Cepa comercial (control)	Cepa 26 en co-cultivo	Cepa 26 (control)
<i>L. lactis</i> Lac13	$(1.17 \pm 0.13) \times 10^9$	$(7.40 \pm 0.74) \times 10^8$	$(1.26 \pm 0.34) \times 10^9$	$(1.84 \pm 0.20) \times 10^9$
<i>L. lactis</i> Lac15	$(1.20 \pm 0.14) \times 10^8$	$(1.52 \pm 0.68) \times 10^8$	$(1.30 \pm 0.13) \times 10^9$	$(2.55 \pm 0.78) \times 10^9$
<i>L. lactis</i> Lac22	$(2.04 \pm 0.79) \times 10^9$	$(1.89 \pm 0.38) \times 10^9$	$(1.83 \pm 0.10) \times 10^9$	$(3.20 \pm 0.29) \times 10^9$
<i>S. thermophilus</i> St1	$(3.80 \pm 0.31) \times 10^8$	$(7.75 \pm 0.92) \times 10^8$	$(6.68 \pm 0.67) \times 10^8$	$(6.05 \pm 0.07) \times 10^8$
<i>S. thermophilus</i> St2	$(5.54 \pm 0.86) \times 10^8$	$(6.96 \pm 0.32) \times 10^8$	$(2.60 \pm 0.42) \times 10^9$	$(1.83 \pm 0.07) \times 10^9$
<i>S. thermophilus</i> St5	$(4.97 \pm 0.88) \times 10^8$	$(4.07 \pm 0.48) \times 10^8$	$(1.52 \pm 0.34) \times 10^9$	$(1.88 \pm 0.51) \times 10^9$
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Ldb1	$(2.59 \pm 0.23) \times 10^7$	$(4.87 \pm 0.79) \times 10^7$	$(4.37 \pm 0.90) \times 10^9$	$(4.73 \pm 0.11) \times 10^9$
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Ldb3	$(6.80 \pm 0.99) \times 10^8$	$(5.39 \pm 0.40) \times 10^8$	$(3.50 \pm 0.93) \times 10^8$	$(4.03 \pm 0.57) \times 10^8$
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ldl10	$(4.01 \pm 0.56) \times 10^7$	$(1.91 \pm 0.11) \times 10^7$	$(4.10 \pm 0.89) \times 10^8$	$(4.80 \pm 0.57) \times 10^8$
<i>L. helveticus</i> Lh5	$(5.09 \pm 0.10) \times 10^8$	$(4.81 \pm 0.20) \times 10^8$	$(1.19 \pm 0.23) \times 10^9$	$(1.34 \pm 0.20) \times 10^9$

**Tabla 2:** Recuentos bacterianos (UFC/mL) de la cepa 95 y cepas BAL comerciales en presencia de confrontación y ausencia de ésta (control).

Cepas BAL comerciales confrontadas	Cepa comercial en co-cultivo	Cepa comercial (control)	Cepa 95 en co-cultivo	Cepa 95 (control)
<i>L. lactis</i> Lac13	$(4.80 \pm 0.70) \times 10^8$	$(5.35 \pm 0.50) \times 10^8$	$(1.24 \pm 0.06) \times 10^9$	$(3.01 \pm 0.13) \times 10^9$
<i>L. lactis</i> Lac15	$(5.50 \pm 0.79) \times 10^8$	$(2.50 \pm 0.13) \times 10^8$	$(3.95 \pm 0.49) \times 10^9$	$(5.45 \pm 0.35) \times 10^9$
<i>L. lactis</i> Lac22	$(5.00 \pm 0.78) \times 10^8$	$(7.09 \pm 0.27) \times 10^8$	$(7.05 \pm 0.85) \times 10^9$	$(5.82 \pm 0.65) \times 10^9$
<i>S. thermophilus</i> St1	$(1.70 \pm 0.99) \times 10^8$	$(5.55 \pm 0.78) \times 10^8$	$(6.62 \pm 0.52) \times 10^8$	$(1.48 \pm 0.26) \times 10^9$
<i>S. thermophilus</i> St2	$(9.70 \pm 0.21) \times 10^8$	$(7.60 \pm 0.27) \times 10^8$	$(1.47 \pm 0.50) \times 10^9$	$(2.53 \pm 0.50) \times 10^9$
<i>S. thermophilus</i> St5	$(2.29 \pm 0.24) \times 10^8$	$(6.25 \pm 0.79) \times 10^8$	$(2.05 \pm 0.30) \times 10^9$	$(3.39 \pm 0.42) \times 10^9$
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Ldb1	$(5.45 \pm 0.37) \times 10^6$	$(4.32 \pm 0.85) \times 10^6$	$(7.25 \pm 0.50) \times 10^8$	$(1.90 \pm 0.81) \times 10^9$
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Ldb3	$(4.36 \pm 0.44) \times 10^7$	$(7.45 \pm 0.67) \times 10^7$	$(5.95 \pm 0.38) \times 10^9$	$(5.05 \pm 0.85) \times 10^9$
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ldl10	$(8.57 \pm 0.92) \times 10^6$	$(8.68 \pm 0.96) \times 10^6$	$(1.75 \pm 0.35) \times 10^9$	$(2.35 \pm 0.92) \times 10^9$
<i>L. helveticus</i> Lh5	$(6.09 \pm 0.62) \times 10^7$	$(7.57 \pm 0.23) \times 10^7$	$(1.08 \pm 0.11) \times 10^9$	$(8.96 \pm 0.57) \times 10^8$

Los recuentos obtenidos para cada cepa confrontada estuvieron en el mismo orden logarítmico que en la condición control. Los resultados correspondientes a las cepas crecidas en co-cultivo fueron comparados estadísticamente con los pertenecientes a los controles. El análisis mencionado no encontró diferencias significativas entre dichos datos ( $p > 0.05$ ). Lo anterior sugiere que no existieron interacciones de antagonismo entre las cepas anticlostridiales y las cepas provenientes de fermentos de quesería.

En la segunda etapa de la investigación se determinaron las velocidades de crecimiento (constante K) de las cepas evaluadas, en presencia y ausencia de confrontación, a partir de sus cinéticas de crecimiento en un dispositivo de dos compartimentos (figura 1). En el anexo II se compilaron las gráficas de linealización realizadas para determinar la pendiente asociada a la fase de crecimiento exponencial de cada cepa confrontada, y calcular la constante K a partir de dicho dato. También se evaluó la actividad acidificante ( $\Delta pH$ ) desarrollada por las cepas en ambas condiciones experimentales luego de las 7 horas de crecimiento.



**Figura 1:** Crecimiento de *Lacticaseibacillus* 26 (izquierda) y *S. thermophilus* St2 (derecha) en dispositivo de dos compartimientos conteniendo caldo MRS.

En las tablas 2 y 3 se encuentran los valores promediados de los parámetros analizados para las cepas BAL comerciales. Los resultados hallados fueron comparados estadísticamente con los obtenidos en ausencia de confrontación mediante el método de One-Way ANOVA ( $p < 0.05$ ). En los ensayos experimentales realizados con la cepa 26 (tabla 3), no se detectaron diferencias significativas en las velocidades de crecimiento de las cepas BAL comerciales en los ensayos de confrontación realizados con la cepa 26 ( $p > 0.05$ ). Con respecto a la tasa de acidificación del medio de cultivo en dichas confrontaciones, sólo se detectaron diferencias significativas en los ensayos realizados con *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ldb1 y *L. helveticus* Lh5 ( $p < 0.05$ ). En ambos casos, el descenso del pH del medio de cultivo fue mayor en presencia de la cepa 26 que en el control. En dichas confrontaciones la acidificación del medio de cultivo se debió principalmente a la actividad acidificante de *Lacticaseibacillus* 26 porque la correspondiente a las cepas BAL comerciales fue baja.

<b>Tabla 3:</b> Velocidad de crecimiento (constante K) y tasa de acidificación ( $\Delta pH$ ) de cepas BAL comerciales al confrontarlas con <i>Lacticaseibacillus</i> 26, y en ausencia de confrontación.		
	Constante K ( $h^{-1}$ )	$\Delta pH$
<b><i>S. thermophilus</i> St1</b>		
Confrontación:	0.74	1.35
Sin confrontación:	0.87	1.48
<b><i>S. thermophilus</i> St2</b>		
Confrontación:	0.93	1.03
Sin confrontación:	1.05	1.16
<b><i>S. thermophilus</i> St5</b>		
Confrontación:	0.83	1.25
Sin confrontación:	0.97	1.33
<b><i>L. lactis</i> Lc13</b>		
Confrontación:	0.49	1.97
Sin confrontación:	0.52	2.25
<b><i>L. lactis</i> Lc15</b>		
Confrontación:	0.64	1.66
Sin confrontación:	0.62	1.74
<b><i>L. lactis</i> Lc22</b>		
Confrontación:	0.53	1.70
Sin confrontación:	0.54	1.86
<b><i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Ldb1</b>		
Confrontación:	0.22	1.00*
Sin confrontación:	0.30	0.32
<b><i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Ldb3</b>		
Confrontación:	0.44	1.22
Sin confrontación:	0.33	0.36
<b><i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ldl10</b>		
Confrontación:	0.43	1.15
Sin confrontación:	0.45	0.28
<b><i>L. helveticus</i> Lh5</b>		
Confrontación:	0.42	1.35*
Sin confrontación:	0.46	0.44
<b>Nota:</b> (*) diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto a la condición control (ausencia de confrontación).		

En referencia a los resultados obtenidos en los estudios de confrontación con la cepa 95 (tabla 4), *L. helveticus* Lh5 fue la única cepa comercial cuya velocidad de crecimiento difirió significativamente en la condición de confrontación, resultando mayor que en el control ( $p > 0.05$ ). Una posible hipótesis que explicaría el resultado anterior es que la cepa 95 produce metabolitos que estimulan el crecimiento de la cepa Lh5. Por otra parte, la tasa de acidificación del medio de cultivo sólo varió al confrontar la cepa 95 con *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ldb1, siendo inferior a la determinada en la condición control ( $p < 0.05$ ). El resultado anterior se debió a la limitada actividad acidificante de la cepa Ldb1 respecto a la producida por la cepa 95.

<b>Tabla 4:</b> Velocidad de crecimiento (constante K) y tasa de acidificación ( $\Delta pH$ ) de cepas BAL comerciales al confrontarlas con <i>Lactocaseibacillus</i> 95, y en ausencia de confrontación.		
	Constante K ( $h^{-1}$ )	$\Delta pH$
<b><i>S. thermophilus</i> St1</b>		
Confrontación:	0.60	1.18
Sin confrontación:	0.76	1.37
<b><i>S. thermophilus</i> St2</b>		
Confrontación:	0.93	1.28
Sin confrontación:	1.05	1.67
<b><i>S. thermophilus</i> St5</b>		
Confrontación:	0.77	1.35
Sin confrontación:	0.82	1.28
<b><i>L. lactis</i> Lc13</b>		
Confrontación:	0.51	1.88
Sin confrontación:	0.62	2.08
<b><i>L. lactis</i> Lc15</b>		
Confrontación:	0.46	1.54
Sin confrontación:	0.49	1.82
<b><i>L. lactis</i> Lc22</b>		
Confrontación:	0.60	1.87
Sin confrontación:	0.51	1.99
<b><i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Ldb1</b>		
Confrontación:	0.48	0.92*
Sin confrontación:	0.61	0.32
<b><i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Ldb3</b>		
Confrontación:	0.32	0.76
Sin confrontación:	0.34	0.42
<b><i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ldl10</b>		
Confrontación:	0.45	0.86
Sin confrontación:	0.43	0.48
<b><i>L. helveticus</i> Lh5</b>		
Confrontación:	0.62*	0.99
Sin confrontación:	0.59	0.37
<b>Nota:</b> (*) diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto a la condición control (ausencia de confrontación).		

Los datos obtenidos en las dos etapas metodológicas sugieren que las cepas 26 y 95 no tienen actividad inhibitoria contra las cepas BAL comerciales evaluadas. Este resultado es relevante porque las cepas BAL consideradas en la investigación provienen de cultivos iniciadores primarios (SLAB), es decir, son esenciales para acidificar la leche y provocar su coagulación, lo que afecta el rendimiento quesero. El uso de cepas con potencial biotecnológico en la producción de quesos, requiere que sean compatibles con las cepas SLAB adicionadas, con el fin de no afectar el tiempo necesario para que ocurra la coagulación de la leche, ni el rendimiento quesero (Neviani et al., 2013; Geria y Caridi, 2014; Blaya et al., 2018; Gensler et al., 2020; Margalho et al., 2021; Bintsis y Papademas, 2024).

En los ensayos de confrontación realizados, también se analizaron la velocidad de crecimiento y la actividad acidificante de las cepas 26 y 95 (tabla 5). El análisis

estadístico de los datos obtenidos sólo detectó una reducción significativa ( $p < 0.05$ ) en la velocidad de crecimiento de *Lacticaseibacillus* 26 en presencia de *L. lactis* Lc13 y *L. helveticus* Lh5. En ambos casos los recuentos bacterianos alcanzados por la cepa 26 en presencia y ausencia de confrontación, difirieron en  $< 1$  unidad logarítmica. Por otra parte, se detectó un aumento significativo en la velocidad de crecimiento de las cepas 26 y 95, en presencia de *S. thermophilus* St2 y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Ldb1, respectivamente. Estos resultados podrían sugerir que las cepas anticlostridiales resultan beneficiadas al crecer en presencia de las cepas comerciales antes mencionadas. En las restantes interacciones evaluadas no se detectaron diferencias significativas en los parámetros considerados ( $p > 0.05$ ).

<b>Tabla 5:</b> Velocidad de crecimiento (constante K) y tasa de acidificación ( $\Delta pH$ ) de las cepas 26 y 95 al confrontarlas con cepas BAL comerciales, y en ausencia de confrontación (control).				
	<i>Lacticaseibacillus</i> 26		<i>Lacticaseibacillus</i> 95	
	Constante K ( $h^{-1}$ )	$\Delta pH$	Constante K ( $h^{-1}$ )	$\Delta pH$
<b>Control (sin confrontación):</b>	0.79	1.43	0.64	1.19
<b>Confrontación con:</b>				
<i>S. thermophilus</i> St1	0.65	1.35	0.67	1.18
<i>S. thermophilus</i> St2	0.98*	1.03	0.70	1.28
<i>S. thermophilus</i> St5	0.75	1.25	0.60	1.35
<i>L. lactis</i> Lc13	0.69*	1.97	0.56	1.88
<i>L. lactis</i> Lc15	0.71	1.66	0.55	1.54
<i>L. lactis</i> Lc22	0.73	1.70	0.57	1.87
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Ldb1	0.75	1.00	0.87*	0.92
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Ldb3	0.84	1.22	0.72	0.76
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> Ldl10	0.71	1.15	0.59	0.86
<i>L. helveticus</i> Lh5	0.62*	1.35	0.61	0.99
<b>Nota:</b> (*) diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto a la condición control (ausencia de confrontación).				

En referencia a los distintos ensayos de confrontación en los cuales se detectó un incremento de la velocidad de crecimiento de la cepa anticlostridial o la cepa comercial, se debe mencionar que otros autores que han estudiado las cinéticas de crecimiento de cepas de lactobacilos en co-cultivo con otras cepas BAL han reportado resultados similares a los determinados en esta investigación (Goin, 2010; Sasaki et al., 2014; Ma et al., 2015; Gebreselassie y Beyene, 2016; O'Sullivan et al., 2016; Mugampoza et al., 2019; Ibrahim y Raman, 2021). De acuerdo a los análisis realizados, se esperaría una baja ocurrencia de incompatibilidad entre las cepas anticlostridiales y cepas BAL empleadas en quesería.

### 3.2 Evaluación de la tolerancia de las cepas anticlostridiales al NaCl

Se estudió la capacidad de crecimiento de las cepas 26 y 95 a las concentraciones de sal existentes en quesos duros y semiduros, con este fin se determinó el recuento bacteriano de dichas cepas al cultivarlas en caldo MRS adicionado con NaCl a concentraciones de 0.0 a 2.5 %. Los resultados obtenidos en el estudio (tabla 6), fueron comparados estadísticamente con los obtenidos



en caldo MRS sin adición de NaCl (control). El análisis estadístico no detectó diferencias significativas entre los datos comparados ( $p > 0.05$ ). En base a lo anterior se considera que la viabilidad de las cepas 26 y 95 no sería afectada por el proceso de salado aplicado en la elaboración quesera. Trabajos previos han determinado que las cepas de *Lacticaseibacillus* son capaces de soportar el estrés osmótico producido por altas concentraciones de NaCl mediante síntesis de compuestos denominados osmolitos, tales como colina, trealosa y prolina que se acumulan en el citosol, lo que evita la pérdida del agua intracelular (Papadimitriou et al., 2016; Pinoargote y Ravishankar, 2018; Silva et al., 2019; Zhang et al., 2020; M'hamed et al., 2022; Grujović et al., 2024).

<b>Tabla 6:</b> Recuentos bacterianos (UFC/mL) de las cepas 26 y 95 al cultivarlas en caldo MRS adicionado con NaCl a concentraciones 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 %		
<b>% NaCl</b>	<b>Cepa 26 (UFC/mL)</b>	<b>Cepa 95 (UFC/mL)</b>
<b>0.0</b>	$(4.15 \pm 0.35) \times 10^9$	$(7.15 \pm 0.57) \times 10^9$
<b>0.5</b>	$(3.92 \pm 0.59) \times 10^9$	$(6.30 \pm 0.71) \times 10^9$
<b>1.0</b>	$(4.50 \pm 0.96) \times 10^9$	$(5.16 \pm 0.79) \times 10^9$
<b>1.5</b>	$(2.80 \pm 0.71) \times 10^9$	$(5.30 \pm 0.16) \times 10^9$
<b>2.0</b>	$(3.62 \pm 0.96) \times 10^9$	$(5.54 \pm 0.96) \times 10^9$
<b>2.5</b>	$(3.15 \pm 0.79) \times 10^9$	$(5.10 \pm 0.48) \times 10^9$

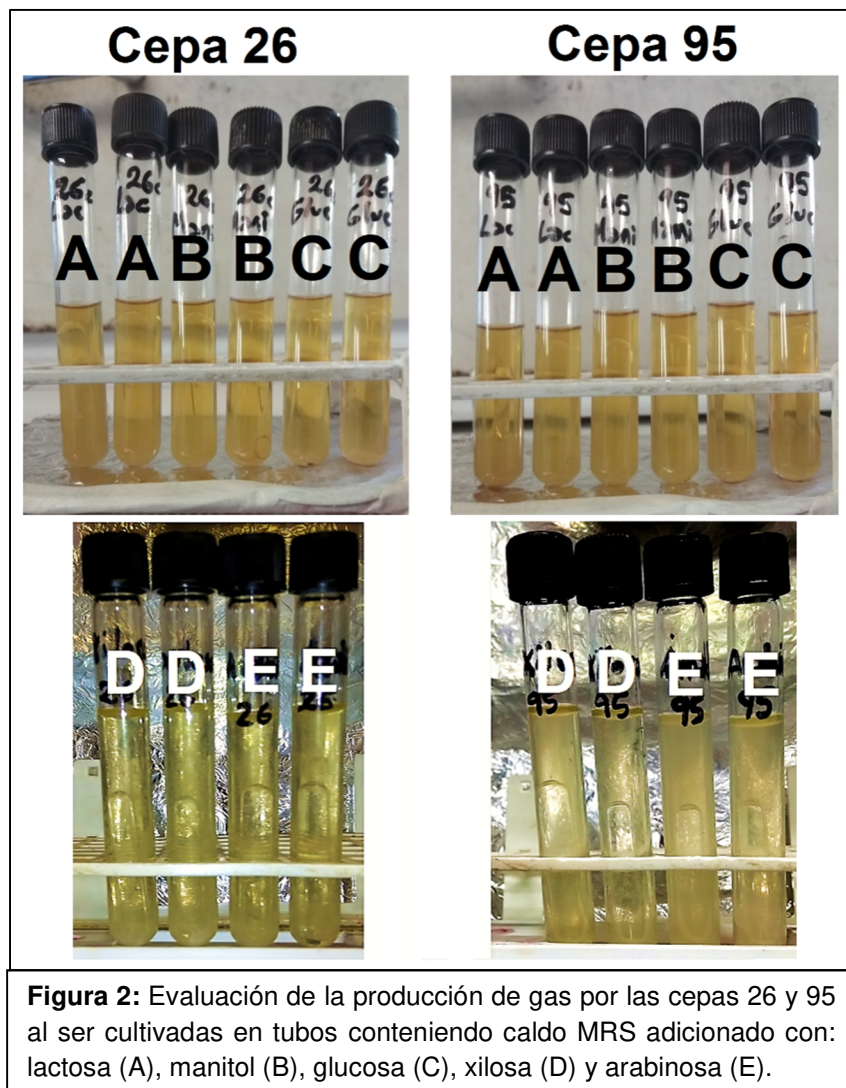
### 3.3 Evaluación de la producción de gas por fermentación de carbohidratos

Se evaluó la producción de CO<sub>2</sub> generado por las cepas 26 y 95 al fermentar los azúcares glucosa, manitol, lactosa, arabinosa y xilosa. El estudio fue realizado porque algunas cepas BAL heterofermentativas producen niveles importantes de CO<sub>2</sub>, cuya acumulación en la masa del queso causa el defecto de hinchazón tardía (Alvenäs, 2015; Khan, 2017; Campfield, 2020; Marco et al., 2020).

Con respecto a los resultados obtenidos, ninguna de las cepas genera cantidades detectables de gas en campana de Durham a partir de los carbohidratos considerados en el análisis (figura 2). En el caso de los carbohidratos glucosa y manitol, que son hexosas, así como para la lactosa que es un disacárido compuesto por glucosa y la hexosa galactosa, los resultados concuerdan con el metabolismo heterofermentativo facultativo que presenta la mayoría de las especies que actualmente integran al género *Lacticaseibacillus*. Estos microorganismos fermentan las hexosas por la vía glucolítica produciendo ácido láctico como producto principal. En cambio, si los carbohidratos disponibles son pentosas como la xilosa y la arabinosa, la fermentación ocurre por la vía pentosa-fosfato, gracias a la expresión de una fosfocetolasa inducible, generando ácido láctico, etanol o ácido acético y CO<sub>2</sub> en igual proporción (Tegopoulos, 2020; Cui y Qu, 2021; Jeyagowri et al., 2023; Colautti et al., 2024; Grabner et al., 2024; Nguyen y Nguyen, 2024).

La ausencia de burbujas en los tubos que contenían xilosa o arabinosa, podría deberse a las siguientes razones: 1) las cepas evaluadas no son capaces de fermentar dichos azúcares (Nigatu et al., 2000; Buron-Moles et al., 2019); 2) hay escasa fermentación de los carbohidratos por lo que la generación de gas no es suficiente para ser detectada en la campana de Durham (Tsunoda et al., 2003; Reiner, 2012; Alves Araújo et al., 2018); 3) si bien las cepas podrían fermentar xilosa y/o arabinosa, el proceso transcurre en forma lenta, con baja producción de CO<sub>2</sub>, del cual una fracción no queda retenida en la campana de Durham y otra se solubiliza en el caldo de cultivo en lugar de acumularse en la campana (Guinet, 1985; Tsunoda et al., 2003; Ngameni Tchoukouang, 2021).

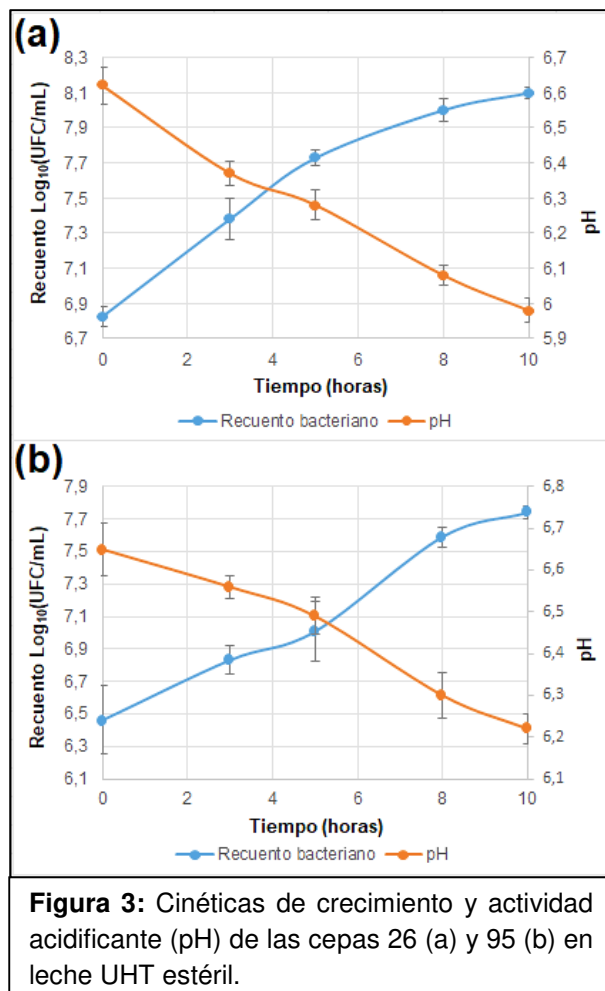
En base a los resultados obtenidos en el estudio, no se esperaba detectar casos de hinchazón tardía al emplear dichas cepas como cultivos adjuntos en elaboraciones queseras.





### 3.4 Estudio de las cinéticas de crecimiento de las cepas 26 y 95 de *Lactocaseibacillus* en leche

Con el fin de propagar las cepas 26 y 95 durante la etapa de escalado previo a su empleo como cultivos adjuntos en elaboraciones queseras, se estudiaron las cinéticas de crecimiento y la actividad acidificante (pH) de dichas cepas al cultivarlas en leche UHT estéril. Los datos de recuento bacteriano (UFC/mL) y los valores de pH determinados a las distintas horas del estudio, se representan gráficamente en la figura 3.



En relación a la cinética de crecimiento de *Lactocaseibacillus* 26 (figura 3a), su fase de crecimiento exponencial finalizó aproximadamente a las 8 horas de ser sembrada en la leche y el recuento microbiano máximo alcanzado por el cultivo fue  $1.25 \times 10^8$  UFC/mL, lo que correspondió a un aumento de 1.27 unidades logarítmicas respecto al recuento bacteriano existente a 0 h. En referencia a la actividad acidificante de la cepa 26, a las 10 h de crecimiento el pH de la leche fue 5.98, resultando en una tasa de acidificación  $\Delta\text{pH} = 0.64$ .

Con respecto a *Lactocaseibacillus* 95 (figura 3b), la fase de crecimiento exponencial también abarcó 8 h aproximadamente. El recuento bacteriano máximo correspondió a  $5.50 \times 10^7$  UFC/mL, lo que implicó un incremento de 1.28 unidades logarítmicas respecto al recuento bacteriano determinado a 0 h. En lo que respecta a la actividad acidificante de esta cepa, a las 10 h de crecimiento la tasa de acidificación fue  $\Delta\text{pH} = 0.43$  (pH final = 6.22).

De acuerdo a los resultados previamente mencionados, con el fin de mantener las cepas en crecimiento activo durante su propagación en leche, los cultivos bacterianos producidos deberían ser repicados dentro de las 8 h de crecimiento. El compartimiento de las cinéticas de crecimiento, así como la actividad acidificante de las cepas evaluadas, concuerdan con otros trabajos científicos realizados con cepas de *Lactocaseibacillus casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus* (Ng et al., 2014; Sakai et al., 2018; de Oliveira Vogado et al., 2018; Bai et al., 2020; Bengoa, 2020; Hussain et al., 2021; Bettera et al., 2023; Durango Zuleta et al., 2023; Sergeev et al., 2023; Batistela et al., 2025). La mayoría de las cepas pertenecientes a las especies bacterianas mencionadas tienen baja capacidad acidificante, esto significa que no son capaces de acidificar la leche a valores de  $\text{pH} < 5.3$  dentro de las 8 horas de crecimiento (Carneiro Ratão, 2011; Beux et al., 2020; Randazzo et al., 2021; Nicosia et al., 2023).

#### 4. Conclusión

En este capítulo se abordaron los estudios de caracterización tecnológica realizados a las cepas 26 y 95 para evaluar su compatibilidad con cepas de bacterias ácido lácticas empleadas como cultivos iniciadores primarios de quesería, así como con el proceso tecnológico aplicado en la producción de quesos. En los análisis desarrollados se determinó que las cepas 26 y 95 fueron compatibles con las cepas provenientes de cultivos iniciadores comerciales, por lo que no sería de esperar que interfirieran en la acción de los mismos. Con respecto a los estudios efectuados para evaluar la adecuación de las cepas anticlostridiales con el proceso de elaboración quesera, se determinó que mantienen su viabilidad a las concentraciones de sal de las salmueras utilizadas en el proceso de elaboración quesera. Asimismo, las cepas 26 y 95 no generan cantidades detectables de  $\text{CO}_2$  al fermentar carbohidratos, en consecuencia, su empleo como cultivos adjuntos de quesería no debería producir ojos no deseados en la horma de los quesos. De acuerdo a los datos obtenidos en los estudios realizados en forma *in vitro*, se esperaría que las cepas anticlostridiales fueran compatibles con el proceso de manufactura y las características del producto final. Sin embargo, deben realizarse elaboraciones queseras a nivel de laboratorio para comprobar si los resultados obtenidos en forma *in vitro* son correctos. Los estudios correspondientes a dicha etapa de investigación se discuten en el capítulo III de esta tesis.

## 5. Bibliografía

Abarquero, D., Bodelón, R., Manso, C., Rivero, P., Fresno, J. M., & Tornadijo, M. E. (2023). Effect of autochthonous starter and non-starter cultures on the physicochemical, microbiological and sensorial characteristics of Castellano cheese. *International Journal of Dairy Technology*, Vol. 77, No. 1, 234 - 245. DOI: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.13007>

Adnan, M., Patel, M., & Hadi, S. (2017). Functional and health promoting inherent attributes of *Enterococcus hirae* F2 as a novel probiotic isolated from the digestive tract of the freshwater fish *Catla catla*. *PeerJ*, Vol. 5, e3085. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.3085>

Ajao, O., Banwo, K., Ogunremi, O., & Sanni, A. (2018). Antimicrobial properties and probiotic potentials of lactic acid bacteria isolated from raw beef in Ibadan, Nigeria. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, Vol. 8, No. 2, 770 - 773. DOI: <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2018.8.2.770-773>

Alvenäs, A. (2015). Cheeses with blowing defects. Problematics and preventable methods. [Bachelor thesis, Swedish University of Agricultural Science] Epsilon Archive for Student Projects. Publikation/Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för Livsmedelsvetenskap, No 412. <https://stud.epsilon.slu.se/8424/>

Alves Araújo, J., Abreu-Lima, T.L., & Carreiro, S.C. (2018). Selection and identification of xylose-fermenting yeast strains for ethanol production from lignocellulosic biomass. *Boletim Do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, Vol. 36, No. 1. DOI: <https://doi.org/10.5380/bceppa.v36i1.59557>

Aziz, T., Li, Z., Naseeb, J., Sarwar, A., Zhao, L., Lin, L., & Al Asmari, F. (2024). Role of bacterial exopolysaccharides in edible films for food safety and sustainability. Current trends and future perspectives. *Italian Journal of Food Science*, Vol. 36, No. 4, 169 - 179. DOI: <https://doi.org/10.15586/ijfs.v36i4.2690>

Bai, M., Huang, T., Guo, S., Wang, Y., Wang, J., Kwok, L.-Y., Dan, T., Zhang, H., & Bilige, M. (2020). Probiotic *Lactobacillus casei* Zhang improved the properties of stirred yogurt. *Food Bioscience*, Vol. 37, 100718. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100718>

Barzideh, Z., Siddiqi, M., Mohamed, H.M., & LaPointe, G. (2022). Dynamics of starter and non-starter lactic acid bacteria populations in long-ripened Cheddar cheese using propidium monoazide (PMA) treatment. *Microorganisms*, Vol. 10, No. 8, 1669. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081669>

Batistela, M.E., Bergamini, C.V., Ale, E.C., & Peralta, G.H. (2025). Unlocking the potential of *Lactocaseibacillus rhamnosus* 73 as a ripening agent in semi-hard cheese after freeze-drying and a six-month storage period. *Fermentation*, Vol. 11, No. 7, 409. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation11070409>

Bengoa, A.A. (2020). Alimentos funcionales: leches fermentadas con bacterias ácido lácticas productoras de exopolisacáridos con propiedades antiinflamatorias

en el tracto gastrointestinal. [Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata]. SEDICI. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/90208>. DOI: <https://doi.org/10.35537/10915/90208>

Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., & Cogan, T.M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, Vol. 11, No. 4 - 7, 259 - 274. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(01\)00056-5](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(01)00056-5)

Bettera, L., Levante, A., Bancalari, E., Bottari, B., Cirlini, M., Neviani, E., & Gatti, M. (2023). *Lactocaseibacillus* strains isolated from raw milk: screening strategy for their qualification as adjunct culture in cheesemaking. *Foods*, Vol. 12, No. 12, 3949. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12213949>

Beux, S., Todescatto, C., Marchi, J.F., & Pereira, E.A. (2020). Selection of raw cow's milk thermophilic lactic acid bacteria obtained from southwest Parana, Brazil, with potential use as autochthonous starter. *Brazilian Journal of Food Technology*, Vol. 23, e2019070. DOI: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.17019>

Bintsis, T., & Papademas, P. (2024). The application of protective cultures in cheese: a review. *Fermentation*, Vol. 10, No. 3, 117. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation10030117>

Blaiotta, G., Aponte, M., & Poltronieri, P. (2018). Growth needs and culture media for LAB and dairy-associated species (Chapter 7). In P. Poltronieri (Ed.), *Microbiology in dairy processing: challenges and opportunities* (1st. ed., pp. 123 - 137). John Wiley & Sons Ltd. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119115007.ch7>

Blaya, J., Barzideh, Z., & LaPointe, G. (2018). Symposium review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. *Journal of Dairy Science*, Vol. 101, No. 4, 3611 - 3629. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13345>

Buron-Moles, G., Chailyan, A., Dolejs, I., Forster, J., & Mikš, M.H. (2019). Uncovering carbohydrate metabolism through a genotype-phenotype association study of 56 lactic acid bacteria genomes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 103, No. 7, 3135 - 3152. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09701-6>

Campfield, V.D. (2020). Observed defects of Swiss cheese based on the microbiome contribution to the production of organic acids. [Master's thesis, Boise State University]. DOI: <https://doi.org/10.18122/td/1775/boisestate>

Carminati, D., Giraffa, G., Zago, M., Marcó, M.B., Guglielmotti, D., Binetti, A., & Reinheimer, J. (2016). Lactic acid bacteria for dairy fermentations (Chapter 12). In F. Mozzi, R.R. Raya, & G.M. Vignolo (Eds.), *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications* (2nd. ed., pp. 191 - 208). John Wiley & Sons, Ltd. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781118868386.ch12>

Carneiro Ratão, I.M. (2011). Microbiological and chemical characterization of traditional cheese made from milk produced by the Algarvian goat breed. [PhD

dissertation, Cranfield University]. CERES Research Repository.  
<http://dspace.lib.cranfield.ac.uk/handle/1826/6794>

Çetin, B., Usal, M., Aloğlu, H.Ş., Busch, A., Dertli, E., & Abdulmawjood, A. (2024). Characterization and technological functions of different lactic acid bacteria from traditionally produced Kirklareli white brined cheese during the ripening period. *Folia Microbiologica*, Vol. 69, No. 5, 1069 - 1081. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12223-024-01141-8>

Chowdhury, A., Hossain, M.N., Mostazir, N.J., Fakruddin, M., Billah, M.M., & Ahmed, M.M. (2012). Screening of *Lactobacillus* spp. from Buffalo yoghurt for probiotic and antibacterial activity. *Bacteriology & Parasitology*, Vol. 3, No. 8, 1000156. DOI: <https://doi.org/10.4172/2155-9597.1000156>

Coelho, M.C., Malcata, F.X., & Silva, C.C.G. (2022). Lactic acid bacteria in raw-milk cheeses: from starter cultures to probiotic functions. *Foods*, Vol. 11, No. 15, 2276. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods11152276>

Colautti, A., Ginaldi, F., Camprini, L., Comi, G., Reale, A., & Iacumin, L. (2024). Investigating safety and technological traits of a leading probiotic species: *Lacticaseibacillus paracasei*. *Nutrients*, Vol. 16, No. 14, 2212. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu16142212>

Colautti, A., Rossi, N., Piazza, C., Comi, G., & Iacumin, L. (2023). Draft genome sequences of 14 *Lacticaseibacillus* spp. strains, representatives of a collection of 200 strains. *Microbiology Resource Announcements*, Vol. 12, No. 10. DOI: <https://doi.org/10.1128/mra.00485-23>

Cui, Y., & Qu, X. (2021). Genetic mechanisms of prebiotic carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria: emphasis on *Lacticaseibacillus casei* and *Lacticaseibacillus paracasei* as flexible, diverse and outstanding prebiotic carbohydrate starters. *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 115, 486 - 499. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.058>

De Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 23, No. 1, 130 - 135.

de Oliveira Vogado, C., dos Santos Leandro, E., Puppim Zandonadi, R., Rodrigues de Alencar, E., Cortez Ginani, V., Yoshio Nakano, E., Habú, S., & Araújo Aguiar, P. (2018). Enrichment of probiotic fermented milk with green banana pulp: characterization microbiological, physicochemical and sensory. *Nutrients*, Vol. 10, No. 4, 427. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu10040427>

Dolci, P., & Cocolin, L.S. (2017). Starter strains and adjunct non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) in dairy products (Chapter 10). In P. Poltronieri (ed.), *Microbiology in dairy processing: challenges and opportunities* (1st. ed. , pp. 177 - 189). DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119115007.ch10>

Dugat-Bony, E., Sarthou, A.-S., Perello, M.-C., de Revel, G., Bonnarme, P., & Helinck, S. (2016). The effect of reduced sodium chloride content on the

microbiological and biochemical properties of a soft surface-ripened cheese. *Journal of Dairy Science*, Vol. 99, No. 4, 2502 - 2511. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10502>

Durango Zuleta, M.M., Grisales Rojas, L.F., Sepúlveda Valencia, J.U., Valdés Duque, B.E., & Moreno-Herrera, C.X. (2023). Growth kinetics of autochthonous lactic acid bacteria isolated from double Cream cheese as potential starter culture. *Tecnológicas*, Vol. 26, No. 57, e2657. DOI: <https://doi.org/10.22430/22565337.2657>

Faria Silva, L., Sunakozawa, T.N., Alves Monteiro, D., Casella, T., Conti, A.C., Todorov, S.D., & Barretto Penna, A.L. (2023). Potential of cheese-associated lactic acid bacteria to metabolize citrate and produce organic acids and acetoin. *Metabolites*, Vol. 13, No. 11, 1134. DOI: <https://doi.org/10.3390/metabo13111134>

Funck, G.D., de Lima Marques, J., da Silva Dannenberg, G., dos Santos Cruxen, C.E., Sehn, C.P., Prigol, M., Silva, M.R.P., da Silva, W.P., & Fiorentini, Â.M. (2019). Characterization, toxicity, and optimization for the growth and production of bacteriocin-like substances by *Lactobacillus curvatus*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, Vol. 12, No. 1, 91 - 101. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09531-y>

García-Cano, I., Rocha-Mendoza, D., Ortega-Anaya, J., Wang, K., Kosmerl, E., & Jiménez-Flores, R. (2019). Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 103, No. 13, 5243 - 5257. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09844-6>

Gebreselassie, N., & Beyene, F. (2016). Starter culture development for spontaneously fermented buttermilk. *Research & Reviews: A Journal of Biotechnology*, Vol. 6, No. 1, 11 - 25.

Gensler, C.A., Brown, S.R.B., Aljasir, S.F., & D'Amico, D.J. (2020). Compatibility of commercially produced protective cultures with common cheesemaking cultures and their antagonistic effect on foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, Vol. 83, No. 6, 1010 - 1019. DOI: <https://doi.org/10.4315/jfp-19-614>

Geria, M., & Caridi, A. (2014). Methods to assess lactic acid bacteria diversity and compatibility in food. *Acta Alimentaria*, Vol. 43, No. 1, 96 - 104. DOI: <https://doi.org/10.1556/aalim.43.2014.1.10>

Goin, C.D. (2010). Growth of lactic acid bacteria: influence of proto-cooperation, bacteriophage infection, and prebiotic carbohydrates. [Master's thesis, University of Nebraska]. DigitalCommons@UNL. Dissertations and Theses in Biological Sciences, 16. <https://digitalcommons.unl.edu/bioscidiss/16>

Grabner F.,M., Grabner H.,M., Schein, H., Schrank, A., Töglhofer, M., Weidenholzer, E., Rückert-Reed, C., Busche, T., & Buchebner-Jance, M. (2024). *Lactocaseibacillus parahuelenbergensis* sp. nov., *Lactocaseibacillus styriensis*



sp. nov. and *Lacticaseibacillus zae* subsp. *silagei* subsp. nov., isolated from different grass and corn silage. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Vol. 74, No. 7. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006441>

Grujović, M.Ž., Marković, K.G., Morais, S., & Semedo-Lemsaddek, T. (2024). Unveiling the potential of lactic acid bacteria from Serbian goat cheese. Foods, Vol. 13, No. 13, 2065. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods13132065>

Guinet, R.M.F. (1985). Miniaturized Durham tubes for carbohydrate fermentation tests by yeasts. Mycoses, Vol. 28, No. 8, 394 - 399. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1985.tb02150.x>

Hussain, N., Li, R., Takala, T.M., Tariq, M., Zaidi, A.H., & Saris, P.E.J. (2021). Generation of lactose- and protease-positive probiotic *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG by conjugation with *Lactococcus lactis* NCDO 712. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 87, No. 6, e02957-20. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.02957-20>

Ibrahim, M., & Raman, K. (2020). Two-species community design of lactic acid bacteria for optimal production of lactate. Computational and Structural Biotechnology Journal, Vol. 19, 6039 - 6049. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.10.24.353805>

Jeyagowri, N., Ranadheera, C.S., Manap, M.Y., Gamage, A., Merah, O., & Madhujith, T. (2023). Phenotypic characterisation and molecular identification of potentially probiotic *Lactobacillus* sp. isolated from fermented rice. Fermentation, Vol. 9, No. 9, 807. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation9090807>

Kaushik, R., & Anand, S. (2025). Studying the population dynamics of NSLAB and their influence on spores during cheese ripening. Applied Microbiology, Vol. 5, No. 3, 65. DOI: <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol5030065>

Kavitake, D., Kandasamy, S., Devi, P.B., & Shetty, P.H. (2018). Recent developments on encapsulation of lactic acid bacteria as potential starter culture in fermented foods - a review. Food Bioscience, Vol. 21, 34 - 44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.11.003>

Khan, D. (2017). Studying microflora of semi-hard cheese, and sporulation within contact surface biofilms. [Master's thesis, South Dakota State University]. Open PRAIRIE. <https://openprairie.sdstate.edu/etd/1726>

Khosravi, Y., Dieye, Y., Loke, M.F., Goh, K.L. and Vadivelu, J. (2014). *Streptococcus mitis* induces conversion of *Helicobacter pylori* to coccoid cells during co-culture *in vitro*. PLoS ONE, Vol. 9, No. 11, e112214. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112214>

Liu, Y., Alexeeva, S., Bachmann, H., Guerra Martínez, J. A., Yeremenko, N., Abee, T., & Smid, E.J. (2022). Chronic release of tailless phage particles from

*Lactococcus lactis*. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 88, No.1, e01483-21. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.01483-21>

Ma, C., Ma, A., Gong, G., Liu, Z., Wu, Z., Guo, B., & Chen, Z. (2015). Craking *Streptococcus thermophilus* to stimulate the growth of the probiotic *Lactobacillus casei* in co-culture. International Journal of Food Microbiology, Vol. 210, 42 - 46. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.034>

Marco, M., Xue, Z., Brooks, J., Quart, Z., Stevens, E., Kable, M., Heidenreich, J., & Mcleod, J. (2020). Identification and confirmation of slit defect-causing bacteria in Cheddar cheese. Research Square, preprint. DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-17517/v1>

Margalho, L.P., Kamimura, B.A., Brexó, R.P., Alvarenga, V.O., Cebeci, A.S., Janssen, P.W.M., Dijkstra, A., Starrenburg, M.J.C., Sheombarsing, R.S., Cruz, A.G., Alkema, W., Bachmann, H., & Sant'Ana, A.S. (2021). High throughput screening of technological and biopreservation traits of a large set of wild lactic acid bacteria from Brazilian artisanal cheeses. Food Microbiology, Vol. 100, 103872. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103872>

Martini, S., Sola, L., Cattivelli, A., Cristofolini, M., Pizzamiglio, V., Tagliazucchi, D., & Solieri, L. (2024). Cultivable microbial diversity, peptide profiles, and bio-functional properties in Parmigiano Reggiano cheese. Frontiers in Microbiology, Vol. 15, 1342180. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1342180>

M'hamed, A.C., Ncib, K., Merghni, A., Migaou, M., Lazreg, H., Snoussi, M., Noumi, E., Mansour, M.B., & Maaroufi, R.M. (2022). Characterization of probiotic properties of *Lacticaseibacillus paracasei* L2 isolated from a traditional fermented food "Lben". Life, Vol. 13, No. 1, 21. DOI: <https://doi.org/10.3390/life13010021>

Moutinho, T.M.Jr., Panagides, J.C., Biggs, M.B., Medlock, G.L., Kolling, G.L., & Papin, J.A. (2017). Novel co-culture plate enables growth dynamic-based assessment of contact-independent microbial interactions. PLoS ONE, Vol. 12, No. 8, e0182163. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182163>

Mugampoza, D., Gkatzionis, K., Linforth, R.S.T., & Dodd, C.E.R. (2019). Acid production, growth kinetics and aroma profiles of *Lactobacillus* flora from Stilton cheese. Food Chemistry, Vol. 278, 222 - 231. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.082>

Muharram, L.H., Haryanto, H., Pertiwi, W., Hernahadini, N., & Mukaromah, I. (2025). *Weissella paramesenteroides*: a lactic acid bacteria producing glutathione from fermented vegetable based Keciwis leaf. Jurnal Biodjati, Vol. 10, No. 1, 55 - 65.

Mulaw, G., Sisay Tessema, T., Muleta, D., & Tesfaye, A. (2019). *In vitro* evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from some Traditionally fermented Ethiopian food products. International Journal of Microbiology, Vol. 2019, 7179514. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/7179514>



Neviani, E., Bottari, B., Lazzi, C., & Gatti, M. (2013). New developments in the study of the microbiota of raw-milk, long-ripened cheeses by molecular methods: the case of Grana Padano and Parmigiano Reggiano. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 4, 36. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00036>

Ngameni Tchoukouang, R.D. (2021). Method development & validation for the efficient detection of super-attenuating (over-fermenting) yeast contaminants (*Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*) in the brewery industry. [Master's thesis, Universidade do Algarve]. Sapiencia UAlg Scientific Repository <http://hdl.handle.net/10400.1/17791>

Nicosia, F.D., Pino, A., Maciel, G.L.R., Sanfilippo, R.R., Caggia, C., de Carvalho, A.F., & Randazzo, C.L. (2023). Technological characterization of lactic acid bacteria strains for potential use in cheese manufacture. *Foods*, Vol. 12, No. 6, 1154. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12061154>

Nigatu, A., Ahrné, S., & Molin, G. (2000). Temperature-dependent variation in API 50 CH fermentation profiles of *Lactobacillus* species. *Current Microbiology*, Vol. 41, No. 1, 21 - 26. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002840010085>

Nikoloudaki, O. (2021). Raw cows milk microbial composition and correlation to multiple farming conditions with deeper insights on the lactic microbiome and its related functionality for traditional cheese making. [PhD dissertation, Faculty of Science and Technology]. The Bozen-Bolzano Institutional Archive. <https://hdl.handle.net/10863/34233>

Ng, S.Y., Chia, L.W., Padam, B.S., & Chye, F.Y. (2014). Effect of selected oligosaccharides on the viability and fermentation kinetics of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in cultured milk. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*, Vol. 4, No. 2, 92 - 99. DOI: <https://doi.org/10.6000/1927-5951.2014.04.02.4>

Nguyen, P.-T., & Nguyen, H.-T. (2024). Environmental stress for improving the functionality of lactic acid bacteria in malolactic fermentation. *The Microbe*, Vol. 4, 100138. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100138>

O'Sullivan, D.J., McSweeney, P.L.H., Cotter, P.D., Giblin, L., & Sheehan, J.J. (2016). Compromised *Lactobacillus helveticus* starter activity in the presence of facultative heterofermentative *Lactobacillus casei* DPC6987 results in atypical eye formation in Swiss-type cheese. *Journal of Dairy Science*, Vol. 99, No. 4, 2625 - 2640. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10503>

Özogul, F., & Hamed, I. (2018). The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol. 58, No. 10, 1660 - 1670. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1277972>

Palavecino Prpich, N.Z., Camprubí, G.E., Cayré, M.E., & Castro, M.P. (2021). Indigenous microbiota to leverage traditional dry sausage production.

International Journal of Food Science, Vol. 2021, 1 - 15. DOI: <https://doi.org/10.1155/2021/6696856>

Papadimitriou, K., Alegría, A., Bron, P.A., de Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M., Lemos, J.A., Linares, D.M., Ross, P., Stanton, C., Turróni, F., van Sinderen, D., Varmanen, P., Ventura, M., Zúñiga, M., Tsakalidou, E., & Kok, J. (2016). Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 80, No. 3, 837 - 890. DOI: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00076-15>

Pinoargote, G., & Ravishankar, S. (2018). Effects of salinity on acid production and growth of three probiotic microbes with potential for application in intensive shrimp aquaculture. *Journal of Probiotics & Health*, Vol. 6, No. 1, 1000191. DOI: <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000191>

Putri, D.A., Lei, J., Rossiana, N., & Syaputri, Y. (2024). Biopreservation of food using bacteriocins from lactic acid bacteria: classification, mechanisms, and commercial applications. *International Journal of Microbiology*, Vol. 2024, 8723968. DOI: <https://doi.org/10.1155/ijm/8723968>

Raj, T., Chandrasekhar, K., Kumar, A.N., & Kim, S.-H. (2021). Recent biotechnological trends in lactic acid bacterial fermentation for food processing industries. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, Vol. 2, No. 1, 14 - 40. DOI: <https://doi.org/10.1007/s43393-021-00044-w>

Randazzo, C. L., Liotta, L., Angelis, M.D., Celano, G., Russo, N., Hoorde, K.V., Chiofalo, V., Pino, A., & Caggia, C. (2021). Adjunct culture of non-starter lactic acid bacteria for the production of Provola Dei Nebrodi PDO cheese: *in vitro* screening and pilot-scale cheese-making. *Microorganisms*, Vol. 9, No. 1, 179. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010179>

Reiner, K. (2012) Carbohydrate fermentation protocol. *Energy*, Vol. 11, 12.

Reinheimer, J. (2022). Los quesos argentinos. Producción, características y nuevas propuestas. Colección Ciencia y Tecnología. Ediciones UNL. Santa Fe, Argentina.

Ribeiro, S.C., Coelho, M.C., & Silva, C.C.G. (2021). A rapid screening method to evaluate acidifying activity by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 185, 106227. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106227>

Ritschard, J.S., & Schuppler, M. (2024). The microbial diversity on the surface of smear-ripened cheeses and its impact on cheese quality and safety. *Foods*, Vol. 13, No. 2, 214. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods13020214>

Ruvalcaba-Gómez, J.M., Ruiz-Espinosa, H., Méndez-Robles, M.D., Arteaga-Garibay, R.I., Anaya-Esparza, L.M., Villagrán, Z., & Delgado-Macuil, R.J. (2022). Use of autochthonous lactic acid bacteria as starter culture of pasteurized milk Adobera cheese. *Fermentation*, Vol. 8, No. 5, 234. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation8050234>

Sakai, T., Moteki, Y., Takahashi, T., Shida, K., Kiwaki, M., Shimakawa, Y., Matsui, A., Chonan, O., Morikawa, K., Ohta, T., Ohshima, H. and Furukawa, S. (2018). Probiotics into outer space: feasibility assessments of encapsulated freeze-dried probiotics during 1 month's storage on the International Space Station. *Scientific Reports*, Vol. 8, No. 1, 10687. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29094-2>

Sasaki, Y., Horiuchi, H., Kawashima, H., Mukai, T., & Yamamoto, Y. (2014). NADH oxidase of *Streptococcus thermophilus* 1131 is required for the effective yogurt fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, Vol. 33, No. 1, 31 - 40. DOI: <https://doi.org/10.12938/bmfh.33.31>

Sergeev, S., Ivanov, G., Goranov, B., Ganeva, Z., & Gaytanska, Y. (2023). Microbial growth kinetics as a method to model and predict the development of starter cultures. *BIO Web of Conferences*, Vol. 58, 01005. DOI: <https://doi.org/10.1051/bioconf/20235801005>

Sionek, B., Szydłowska, A., Trzaskowska, M., & Kołożyn-Krajewska, D. (2024). The impact of physicochemical conditions on lactic acid bacteria survival in food products. *Fermentation*, Vol. 10, No. 6, 298. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation10060298>

Silva, J.A., Marchesi, A., Wiese, B., & Nader-Macias, M.E.F. (2019). Technological characterization of vaginal probiotic lactobacilli: resistance to osmotic stress and strains compatibility. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 127, 1835 - 1847. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.14442>

Taboada, N., Núñez, M., Medina, R., & López Alzogaray, M.S. (2014). Characterization and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditional Argentinean goat's milk products. *Food Biotechnology*, Vol.28, No. 2, 123 - 141. DOI: <https://doi.org/10.1080/08905436.2014.895944>

Tegopoulos, K. (2020). Comparative Genomic analysis of *Lactocaseibacillus casei* strains Συγκριτική γονιδιωματική ανάλυση στελεχών του είδους *Lactocaseibacillus casei*. [Senior thesis, Hellenic Republic Democritus University of Thrace Department of Molecular Biology and Genetics]. Repository of DUTH. <https://repo.lib.duth.gr/jspui/handle/123456789/17162>

Tsunoda, K., Makishima, M., Inoi, R., Sano, A., Inoue, N., & Saito, M. (2003). New method for the observation of gas-production using fiber-stuffed tube for coliform detection and EC-test. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, Vol. 44, No. 1, 54 - 58. DOI: <https://doi.org/10.3358/shokueishi.44.54>

Vencek Enriquez, M. (2025). Characterization and control of *Paucilactobacillus wasatchensis* through evaluation of strain variability, temperature tolerance, starter cultures, and usage of Computed Tomography (CT) imaging for detection and prevention of late blowing defects in cheese. [Master's thesis, Oregon State

University].

ScholarsArchive@OSU.

[https://ir.library.oregonstate.edu/concern/graduate\\_thesis\\_or\\_dissertations/w0892m044](https://ir.library.oregonstate.edu/concern/graduate_thesis_or_dissertations/w0892m044)

Zhang, H., Wang, Q., Liu, H., Kong, B., & Chen, Q. (2020). *In vitro* growth performance, antioxidant capacity and cell surface physiological characteristics of *Pediococcus pentosaceus* R1 and *Lactobacillus fermentum* R6 stressed under different NaCl concentrations. Food & Function, Vol. 11, No. 7, 6376 - 6386. DOI: <https://doi.org/10.1039/c9fo02309g>

## **Capítulo III. Evaluación de la actividad anticlostridial de las cepas 26 y 95 en queso tipo Dambo**

### **1. Introducción**

El queso es un producto lácteo fermentado definido como “el producto fresco o madurado obtenido por el drenaje de líquido (suero lácteo) resultante de la coagulación de la leche, nata, leche desnatada o parcialmente desnatada, suero de manteca o cualquier combinación de estos productos” (Food and Agriculture Organization [FAO], 2013). El proceso de elaboración quesera comprende tres etapas principales: 1) formación del gel o cuajada por coagulación de la leche, 2) deshidratación o sinéresis de la cuajada, 3) proceso de maduración.

La producción industrial de quesos se realiza a partir de la leche pasteurizada y estandarizada en su contenido de grasa y proteína. Una vez que la leche se encuentra en la tina quesera, se adiciona el cultivo iniciador, la enzima quimosina,  $\text{CaCl}_2$  y pueden incorporarse preservantes como la lisozima o sales de nitrato (Şatana, 2018). Las proteínas caseínas de la leche precipitan por la acidificación desarrollada mediante fermentación ácido láctica que producen las bacterias ácido lácticas del cultivo iniciador primario (SLAB), así como por la proteólisis causada por la quimosina. Como resultado de lo anterior se obtiene una red proteica denominada cuajada en la que quedan retenidos la grasa, vitaminas, minerales y parte del agua de la leche (Johnson y Law, 2010; Kindstedt, 2013).

La siguiente etapa de la elaboración consiste en cortar la cuajada en cubos, denominados granos de cuajada, liberándose suero lácteo. Este proceso de deshidratación denominado sinéresis continúa en las etapas posteriores de moldeado, prensado, salado y maduración. Debe mencionarse que algunos tipos de quesos requieren realizar una etapa de cocción y agitación de la cuajada antes del moldeado, manteniéndola a temperaturas entre 35 a 57 °C dependiendo de la variedad elaborada, lo que también favorece la pérdida de suero lácteo (Kindstedt, 2013; Fox et al., 2017). Dependiendo de la intensidad de los parámetros fisicoquímicos asociadas a cada uno de los procesos mencionados, se obtiene un producto final cuya textura presenta mayor o menor dureza. El moldeado y prensado del queso también son necesarios para compactar mejor los granos de cuajada y disminuir la existencia de huecos u ojos mecánicos en la masa interna del queso. Asimismo, las etapas mencionadas aportan una forma homogénea a la horma (Johnson y Law, 2010; Mukhiddinov et al., 2022). Con respecto al salado de los quesos, la mayoría de las variedades se salan por inmersión en salmueras que contienen entre 20 a 22 °Bé (grados Baumé) de sal. Además de la deshidratación del queso, el salado mejora el sabor del producto, favorece su preservación desde el punto de vista microbiológico, regula la actividad de las enzimas bacterianas liberadas en la matriz del queso y contribuye a la generación de su corteza (Goy et al., 2012; Giroux et al., 2022; López González et al., 2024).

En el proceso de maduración, los quesos se mantienen en cámaras de temperatura y humedad controladas para que alcancen las características sensoriales esperadas de textura, sabor y aroma. A nivel industrial, el tiempo de

permanencia de los quesos en dichas cámaras suele ser entre 7 a 270 días dependiendo de la variedad elaborada (Cerutti et al., 2015; Fox et al., 2017; Bezerra et al., 2024). Durante ese período de tiempo los quesos siguen perdiendo humedad, además las bacterias ácido lácticas no iniciadoras (NSLAB) provenientes de la leche y la línea de producción, así como aquellas que son incorporadas como cultivos adjuntos, proliferan convirtiéndose en la microflora predominante (Fox et al., 2017; Zhao et al., 2025). Los procesos metabólicos desarrolladas por las NSLAB, entre ellos la proteólisis, lipólisis y el catabolismo de aminoácidos y ácidos grasos liberados, generan compuestos químicos que contribuyen al perfil organoléptico del producto final (Khattab et al., 2019; Zhao et al., 2025).

El crecimiento de microorganismos contaminantes en los quesos puede causar defectos de textura, sabor y aroma, lo que puede provocar el rechazo por parte de los consumidores y reducir su valor económico. En el caso de los quesos semiduros y duros, uno de los defectos más frecuentes es la aparición de hinchazón tardía, provocado por el desarrollo de cepas de *Clostridium* en la etapa de maduración. La industria láctea dispone de métodos para prevenir el crecimiento de este género bacteriano y reducir la ocurrencia de la alteración, éstos son la microfiltración, la bactofugación y el agregado de lisozima o sales de nitrato como preservantes químicos a la leche. Dichas estrategias de control no son completamente efectivas y presentan desventajas que limitan su uso (Hassan et al., 2021; Sánchez et al., 2024; Velasco et al., 2025). Una alternativa a los métodos mencionados es emplear cepas de bacterias ácido lácticas con actividad anticlostridial como cultivos adjuntos en la producción de quesos. En ese sentido, distintos proveedores de insumos para el sector lácteo, cuentan con cepas BAL biopreservantes seleccionadas para su aplicación en elaboraciones queseras. Asimismo, hay un gran interés a nivel industrial y académico en disponer de nuevas cepas que cumplan esta función y además permitan contribuir al mejoramiento de las características sensoriales de los quesos producidos (Shi y Maktabdar, 2022; Bintsis y Papademas, 2024). Con dicha finalidad, el potencial inhibitorio de las cepas aisladas de leche cruda y/o productos lácteos, debe ser evaluado en estudios de laboratorio, así como en quesos producidos en plantas piloto. A través de estos análisis se busca seleccionar las cepas que ejercen un biocontrol más efectivo y resultan compatibles con cultivos iniciadores y las condiciones de elaboración quesera (Bintsis y Papademas, 2024).

Teniendo en cuenta lo discutido previamente, en el contexto de la línea de investigación abordada en esta tesis, se decidió evaluar la efectividad de la actividad anticlostridial producida por las cepas 26 y 95 al emplearlas como cultivos adjuntos en queso tipo Dambo elaborado a escala de laboratorio. También se consideró necesario analizar la composición de los quesos producidos, para determinar si el desarrollo de las cepas modifica sus características fisicoquímicas. El queso Dambo es originario de Dinamarca y su denominación está protegida legalmente por tener estatus PGI (Protected Geographical Indication), por dicha razón a la versión industrial de este queso se lo define como queso tipo Dambo (Comisión Europea, 2017; Falchi et al., 2023). La variedad producida en forma industrial es descripta por el *Codex Alimentarius* (Comisión del *Codex Alimentarius*, CXS 264-1966, 2022) y la reglamentación

vigente en el MERCOSUR (MERCOSUR/GMC/RES N° 29/96, 2011), como un queso graso, de mediana humedad, consistencia semidura y elástica, textura compacta, no granulosa, que puede o no tener ojos, si los presenta éstos son redondos con un diámetro máximo de 1 cm. El color de la masa es blanco a amarillento y el sabor debe ser láctico, suave y ligeramente salado. El tiempo de maduración mínimo es 25 días a una temperatura entre 12 - 20 °C. Este queso fue seleccionado para realizar los estudios antes citados por ser una de las variedades más afectadas por el defecto de hinchazón tardía, debido a su textura semidura y por requerir un período de maduración de 90 días en hormas de 1 Kg, permitiendo desarrollar los análisis en un tiempo relativamente corto. Además, el queso tipo Dambo puede ser de masa ciega, facilitando la detección de ojos irregulares, rajaduras o cavernas originados por la alteración mencionada. Por otra parte, esta variedad es una de las más exportadas de la producción nacional (Sørensen y Benfeldt, 2001; Panizzolo et al., 2011; Falchi et al., 2023).

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1 Selección de cepas de *C. tyrobutyricum* causantes de hinchazón tardía en queso tipo Dambo**

Las cepas 175.1, 193.5, 206.2 y 206.6 de *C. tyrobutyricum* pertenecientes a la colección de la Unidad de Tecnología de los Alimentos - Facultad de Agronomía, provenientes de quesos con signos de hinchazón tardía, y la cepa *C. tyrobutyricum* ATCC 25755, fueron evaluadas y seleccionadas para su posterior uso como cepas contaminantes en las elaboraciones queseras, donde se estudió la capacidad de las cepas 26 y 95 de prevenir el crecimiento de *Clostridium* y evitar la aparición de hinchazón tardía.

La evaluación de las cepas de *C. tyrobutyricum* se realizó en dos etapas, primero se analizó su interacción con el cultivo iniciador primario (*Lactococcus lactis* R-704) empleado en la producción de queso tipo Dambo, para detectar algún tipo de acción inhibitoria ejercida por el cultivo iniciador contra las cepas clostridiales. En segundo lugar, se determinó la concentración mínima de esporas de cada cepa que es necesaria para provocar la alteración en el tipo de queso elaborado. Las cepas causantes de mayor alteración fueron seleccionadas para emplearlas como cepas contaminantes en los estudios de biocontrol a realizar en los quesos.

El estudio de la interacción entre las cepas de *C. tyrobutyricum* y *L. lactis* R-704, se realizó por determinación del NMP de esporas clostridiales por la técnica de tres diluciones con tres repeticiones (Touraille y Bergère, 1974), en tubos de leche UHT esteril sellados anaeróbicamente con parafina, bajo tres condiciones experimentales: 1) co-cultivo de cepa de *C. tyrobutyricum* y *L. lactis* R-704; 2) cepa de *C. tyrobutyricum* en ausencia de la cepa R-704; 3) *L. lactis* R-704 cultivada sola. En el estudio se emplearon suspensiones de esporas de cada cepa de *C. tyrobutyricum* preparadas como se describe en el punto 2.3 del capítulo I y ajustadas a  $10^6$  esporas/mL. A partir de éstas, se sembraron 100 µL en los tubos correspondientes. La cepa R-704 fue inoculada en los tubos (100 µL) a partir de un cultivo con 24 h de crecimiento en caldo MRS, ajustado a

10<sup>4</sup> UFC/mL mediante absorbancia a 620 nm. En los tubos sembrados con la cepa de *C. tyrobutyricum* y el cultivo de *L. lactis*, primero se inoculó la cepa de R-704 y los tubos fueron incubados a 37 °C durante 24 h en aerobiosis, luego se adicionó la cepa de *C. tyrobutyricum* y se sellaron anaeróbicamente con parafina estéril. Los tubos inoculados únicamente con la cepa R-704 se cultivaron en aerobiosis a 37 °C por 24 h previo a ser sellados con parafina estéril. Todos los tubos fueron incubados a 37 °C durante siete días antes de determinar el NMP de esporas clostridiales.

Con respecto a la determinación de la concentración mínima de esporas de *C. tyrobutyricum* requerida para producir el defecto en queso tipo Dambo, a escala de laboratorio se elaboraron quesos de esta variedad contaminados con suspensiones de esporas clostridiales ajustadas a 10<sup>6</sup> UFC/mL inoculadas a dosis final de 1000, 3000 y 40000 esporas/L de leche en el momento de incorporar el fermento. Los quesos fueron elaborados siguiendo el protocolo descrito en el ítem 2.2 de este capítulo. En los días 15, 30, 45 y 60 de la etapa de maduración, se determinó el Número Más Probable (NMP) de esporas clostridiales por la técnica de tres diluciones con tres repeticiones, presentes en los quesos y éstos fueron inspeccionados visualmente para detectar signos del defecto en la masa del queso: rajaduras, ojos irregulares o cavernas. También se determinó el NMP de esporas clostridiales presentes en la leche empleada en todas las elaboraciones.

## **2.2 Elaboración de queso tipo Dambo a escala de laboratorio**

El protocolo de elaboración se estandarizó considerando un volumen inicial de 15 L de leche cruda que fue suministrada por la estación experimental del Centro Regional Sur de Facultad de Agronomía. La leche se pasteurizó a 65 °C durante 30 min. y fue enfriada hasta alcanzar 38 °C para incorporar CaCl<sub>2</sub> y el fermento R-704 (Chr. Hansen, Dinamarca) siguiendo en ambos casos las indicaciones de los fabricantes. La leche se incubó a 36 °C durante 30 min. y se adicionó la quimosina CHY-MAX® (Chr. Hansen, Dinamarca) que se dejó actuar durante 40 min. La cuajada obtenida fue cortada, luego se retiraron 4.5 L del suero lácteo liberado y 3.75 L de agua estéril a 68 °C se adicionaron durante 20 min. bajo agitación. La cuajada fue transferida a seis moldes de 250 g. Los moldes fueron prensados durante 4 h., incrementando progresivamente la presión hasta alcanzar 3 Kg de presión sobre cada molde. Los quesos fueron desmoldados, mantenidos en salmuera al 23 % NaCl durante 2 h y oreados en heladera por 12 h. Las hormas se maduradas en una cámara de maduración a 15 ± 2 °C, por 60 días (Rosero Lomas y Guacales Gualavisi, 2013; Escobar et al., 2014; Falchi et al., 2023).

## **2.3 Estudio de la actividad anticlostridial de las cepas 26 y 95 en queso tipo Dambo**

La actividad anticlostridial de las cepas 26 y 95 de *Lacticaseibacillus*, fue evaluada en quesos de tipo Dambo contaminados con esporas de cepas de *C. tyrobutyricum* causantes de hinchazón tardía. Las elaboraciones queseras se realizaron a partir de 15 L de leche cruda, siguiendo el protocolo descrito en el ítem 2.2 de este capítulo. Una vez que la leche fue pasteurizada y adicionada



con  $\text{CaCl}_2$  y el fermento R-704, se repartió entre tres recipientes de acero inoxidable (5 L por recipiente) para producir quesos en tres condiciones experimentales: 1) queso control sin incorporación de la cepa anticlostridial ni cepa de *C. tyrobutyricum*, 2) queso contaminado con esporas clostridiales (control positivo de hinchazón tardía), 3) queso que contiene a la cepa anticlostridial y a la cepa de *C. tyrobutyricum* (condición de confrontación). Las suspensiones de esporas clostridiales fueron preparadas como se describe en el ítem 2.3 del capítulo I, se ajustaron a  $10^6$  esporas/mL y fueron sembradas en la leche a la mínima concentración necesaria para causar el defecto de hinchazón tardía. Las cepas 26 y 95 fueron previamente cultivadas en leche de acuerdo a los resultados obtenidos en el ítem 3.4 del capítulo II, se ajustaron a  $10^7$  UFC/mL, y fueron inoculadas al 1 % en la leche de las preparaciones queseras correspondientes. Todos los ensayos experimentales se realizaron por duplicado.

En la leche cruda y en los quesos con 45 y 60 días de maduración se determinó el NMP de esporas clostridiales por la técnica de tres diluciones con tres repeticiones, en tubos conteniendo caldo RCM (Reinforced Clostridium Medium) que se sellaron anaeróbicamente con parafina (Touraille y Bergère, 1974). Asimismo, se cuantificó el contenido de ácido butírico existente en los quesos analizados mediante cromatografía de gases, con la finalidad de emplear este parámetro como otro indicador del desarrollo de bacterias ácido butíricas en las tres condiciones experimentales. La extracción del ácido butírico se realizó siguiendo la metodología descrita por Zeppa et al. (2001) con modificaciones. A partir de cada queso se colectaron 5 g que fueron resuspendidos en 25 mL de la solución de extracción compuesta por  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10 mM y n-hexano (calidad ACS, Sigma-Aldrich, USA) en partes iguales. La suspensión fue homogeneizada en Stomacher durante 10 min. a 260 rpm, y centrifugada a 10000 rpm por 10 min. a 4 °C. La fase acuosa fue extraída con jeringa y filtrada (diámetro poro de 0.45  $\mu\text{m}$ ). El análisis cromatográfico se realizó siguiendo la metodología de Nalepa et al. (2018) en un cromatógrafo de gases Agilent, modelo 8860, empleando una columna de polietilenglicol (PEG) de la marca HP-INNOWAX (30 m x 1.00  $\mu\text{m}$  x 0.537 mm) (Agilent Technologies, USA) con un flujo de 1 mL/min. En la columna se inyectaron 2  $\mu\text{L}$  de muestra. Las condiciones de temperatura aplicadas en el equipo consistieron en una primera etapa a 130 °C durante 3 min., un posterior aumento progresivo de 5 °C/min. hasta alcanzar 180 °C, que se mantuvo durante 7 min. Luego, la temperatura fue incrementada en un gradiente de 10 °C/min. hasta llegar a 240 °C, que se mantuvo constante por 10 min. Cada muestra se analizó por triplicado. La concentración de ácido butírico presente en las muestras analizadas se determinó a partir de los cromatogramas obtenidos, empleando una curva de calibración construida con una solución estándar de ácido butírico 0.32 M (anexo III).

Por otra parte, en los quesos con 45 y 60 días de maduración, se analizaron los parámetros fisicoquímicos de proteína cruda por el método de Kjeldahl (AOAC 2023, método 984.13), materia grasa por el método de Soxhlet (AOAC International, 2023, método 920.39) y extracto seco (AOAC International, 2023, método 930.15). La finalidad del análisis fue determinar si los quesos elaborados con las cepas bioprotectoras presentaban cambios en los parámetros considerados respecto a los valores de referencia fijados por la reglamentación

para el queso Dambo (MERCOSUR/GMC/RES N° 29/96, 2011; Comisión del *Codex Alimentarius*, CXS 264-1966, 2022).

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1 Selección de cepas de *C. tyrobutyricum* causantes de hinchazón tardía en queso tipo Dambo

Las cepas 175.1, 193.5, 206.2, 206.6 y ATCC 25755 de *C. tyrobutyricum*, fueron previamente evaluadas respecto a su interacción con *L. lactis* R-704, para detectar posibles efectos inhibitorios. En el estudio se determinaron los recuentos de NMP de las cepas al ser confrontadas y en ausencia de confrontación. En la tabla 1 se presentan dichos resultados.

**Tabla 1:** NMP de esporas clostridiales en tubos de leche UHT en tres condiciones experimentales: 1) cepa de *C. tyrobutyricum* cultivada sola; 2) co-cultivo de *C. tyrobutyricum* y *L. lactis* R-704; 3) cepa de *L. lactis* R-704 sola.

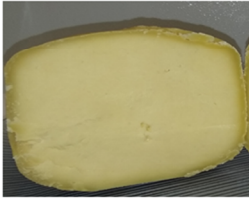
Cepa	<i>C. tyrobutyricum</i>	<i>C. tyrobutyricum</i> + <i>L. lactis</i> R-704	<i>L. lactis</i> R-704
ATCC 25755	2300	29000	<300
175.1	2300	9300	300
193.5	2100	6400	300
206.2	3600	15000	<300
206.6	2800	12000	300

De acuerdo a los resultados obtenidos, en todos los ensayos realizados los recuentos de esporas clostridiales fueron superiores al cultivar las cepas de *C. tyrobutyricum* en presencia de *L. lactis* R-704 que al crecerlas como cultivos puros, en consecuencia, *L. lactis* R-704 no ejercería ningún tipo de actividad anticlostridial contra las cepas evaluadas. Cabe mencionar que los elevados recuentos de esporas clostridiales en presencia del cultivo iniciador, podrían deberse a que *L. lactis* R-704 durante su crecimiento produce ácido láctico y *Clostridium* es capaz de emplear este metabolito como fuente de energía, por lo tanto, la cepa *L. lactis* R-704 podría promover el desarrollo de *Clostridium* (Silvetti et al., 2018).

Con respecto a la determinación de la concentración mínima de esporas de *C. tyrobutyricum* requerida para producir el defecto en queso tipo Dambo, el análisis fue inicialmente realizado para la cepa *C. tyrobutyricum* ATCC 25755, pero no se detectaron signos de hinchazón tardía en ninguno de los quesos elaborados en los tiempos en que éstos fueron analizados. Los valores de NMP de esporas clostridiales determinados en los quesos en dichos tiempos de maduración se muestran en la tabla 2. En base a los resultados obtenidos, se decidió evaluar la ocurrencia de hinchazón tardía por las restantes cepas de *C. tyrobutyricum*, empleando una dosis contaminante de 40000 esporas/L en las elaboraciones

queseras. Asimismo, se ajustaron los tiempos de muestreo a 30, 45 y 60 días de elaborar los quesos. La figura 1 presenta los datos de NMP determinados en los quesos producidos con dichas cepas contaminantes, así como fotos de la masa interna de las hormas analizadas.

<b>Tabla 2:</b> Resultados de NMP de esporas clostridiales (esporas/Kg) en quesos contaminados con la cepa <i>C. tyrobutyricum</i> ATCC 25755 a los 15, 30, 45 y 60 días de maduración. Se incluyen los valores de NMP (esporas/L) en la leche empleada en cada elaboración.					
Dosis inoculada	Leche (0 día)	15 días	30 días	45 días	60 días
1000 esporas/L	2700	3600	7400	7200	7200
3000 esporas/L	2300	<3000	11000	15000	11000
40000 esporas/L	4300	23000	23000	23000	9200

Cepa	leche(0 día)	30 días	45 días	60 días
175.1	2700 esporas/L			
		7200 esporas/Kg	7400 esporas/Kg	3600 esporas/Kg
193.5	2100 esporas/L			
		7400 esporas/Kg	11000 esporas/Kg	14000 esporas/Kg
206.2	2300 esporas/L			
		38000 esporas/Kg	23000 esporas/Kg	43000 esporas/Kg
206.6	2000 esporas/L			
		9200 esporas/Kg	23000 esporas/Kg	460000 esporas/Kg

**Figura 1:** Valores de NMP (esporas/g) presentes en quesos contaminados con cepas de *C. tyrobutyricum* a los 30, 45 y 60 días de su elaboración. Las fotos muestran el estado de la masa interna de los quesos en los tiempos mencionados. Se incluyen los valores de NMP (esporas/L) en la leche empleada en las elaboraciones queseras.

Como se aprecia en la figura 1, las cepas 175.1, 206.2 y 206.6 causaron hinchazón tardía en los quesos contaminados. En el caso de las cepas 175.1 y 206.2 el defecto fue detectado a los 60 días de la elaboración, mientras que en los quesos que contenían a la cepa 206.6, la alteración fue detectable a partir de los 45 días de su producción. Considerando que los quesos contaminados con las cepas 206.2 y 206.6 presentaron mayor deterioro y concentraciones de esporas clostridiales más altas que los elaborados con la cepa 175.1, se decidió seleccionarlos para su uso como cepas contaminantes en los quesos donde posteriormente se evaluó la efectividad de las cepas 26 y 95 para inhibir el desarrollo de *Clostridium* y prevenir la ocurrencia de la alteración.

### 3.2 Estudio de la actividad anticlostridial de las cepas 26 y 95 en queso tipo Dambo

La efectividad de la actividad anticlostridial producida por las cepas 26 y 95 fue evaluada en queso tipo Dambo, empleando las cepas 206.2 y 206.6 de *C. tyrobutyricum* como cepas contaminantes. En los quesos producidos se determinó el NMP de esporas clostridiales y la concentración de ácido butírico a los 45 y 60 días de maduración. Los resultados obtenidos para ambos parámetros en las tres condiciones experimentales, fueron comparados estadísticamente en los tiempos mencionados (tablas 3 y 4). Asimismo, los quesos fueron inspeccionados para detectar signos de hinchazón tardía (figura 2).

**Tabla 3:** Recuento de NMP de esporas clostridiales, contenido de ácido butírico y evaluación de hinchazón tardía, en quesos contaminados con las cepas 206.2 y 206.6 de *C. tyrobutyricum*, en presencia y ausencia (control) de la cepa anticlostridial 26 de *Lacticaseibacillus*.

Ensayo experimental	Tiempo	Condición experimental	NMP (esporas/Kg o L)* <sup>1</sup>	Ácido butírico (mg/Kg)	Hinchazón tardía
26 vs. 206.2	0 día	Control	1450	ND* <sup>2</sup>	ND
		<i>C. tyrobutyricum</i> sólo			
		Confrontación			
	45 días	Control	4050 <sup>a</sup>	12.1 ± 0.6 <sup>a</sup>	-
		<i>C. tyrobutyricum</i> sólo	17500 <sup>b</sup>	21.4 ± 2.3 <sup>b</sup>	-
		Confrontación	26000 <sup>b</sup>	12.5 ± 1.1 <sup>a</sup>	-
	60 días	Control	3600 <sup>a</sup>	14.2 ± 3.3 <sup>a</sup>	-
		<i>C. tyrobutyricum</i> sólo	35500 <sup>b</sup>	93.8 ± 13.3 <sup>b</sup>	+
		Confrontación	25500 <sup>c</sup>	27.4 ± 10.2 <sup>a</sup>	-
26 vs. 206.6	0 día	Control	300	ND	ND
		<i>C. tyrobutyricum</i> sólo			
		Confrontación			
	45 días	Control	3300 <sup>a</sup>	29.4 ± 5.6 <sup>a</sup>	-
		<i>C. tyrobutyricum</i> sólo	40500 <sup>b</sup>	32.7 ± 5.8 <sup>a</sup>	-
		Confrontación	22000 <sup>c</sup>	11.8 ± 0.5 <sup>b</sup>	-
	60 días	Control	3300 <sup>a</sup>	12.9 ± 1.0 <sup>a</sup>	-
		<i>C. tyrobutyricum</i> sólo	27500 <sup>b</sup>	35.5 ± 5.6 <sup>b</sup>	+
		Confrontación	18000 <sup>c</sup>	26.7 ± 0.9 <sup>c</sup>	-

\*<sup>1</sup> Los recuentos de NMP en el día 0 fueron determinados en la leche empleada en las elaboraciones queseras (esporas/L).

\*<sup>2</sup> ND: No determinado.

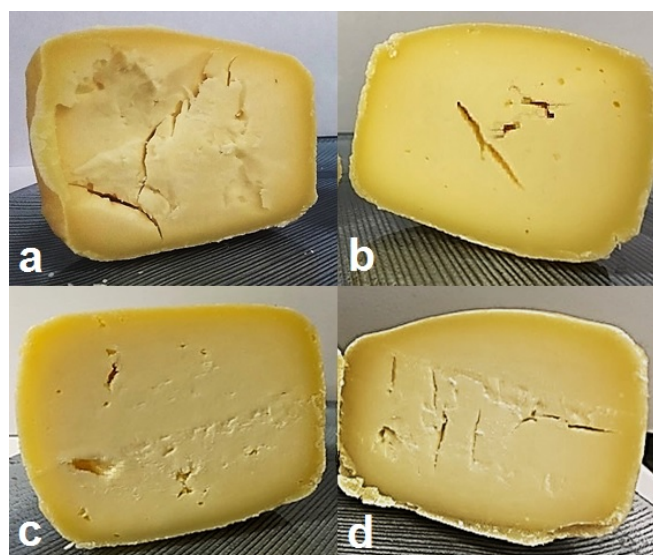


**Tabla 4:** Recuento de NMP de esporas clostridiales, contenido de ácido butírico y evaluación de hinchazón tardía, en quesos contaminados con las cepas 206.2 y 206.6 de *C. tyrobutyricum*, en presencia y ausencia (control) de la cepa anticlostridial 95 de *Lacticaseibacillus*.

Ensayo experimental	Tiempo	Condición experimental	NMP (esporas/Kg o L)* <sup>1</sup>	Ácido butírico (mg/Kg)	Hinchazón tardía
95 vs. 206.2	0 día	Control	455	ND* <sup>2</sup>	ND
		<i>C. tyrobutyricum</i> sólo			
		Confrontación			
	45 días	Control	4600 <sup>a</sup>	25.5 ± 3.7 <sup>a</sup>	-
		<i>C. tyrobutyricum</i> sólo	40500 <sup>b</sup>	50.3 ± 3.3 <sup>b</sup>	-
		Confrontación	21500 <sup>c</sup>	36.9 ± 2.3 <sup>c</sup>	-
	60 días	Control	6150 <sup>a</sup>	49.0 ± 4.3 <sup>ab</sup>	-
		<i>C. tyrobutyricum</i> sólo	84000 <sup>b</sup>	51.0 ± 1.8 <sup>a</sup>	-
		Confrontación	8200 <sup>a</sup>	42.4 ± 0.6 <sup>b</sup>	-
95 vs. 206.6	0 día	Control	1750	ND	ND
		<i>C. tyrobutyricum</i> sólo			
		Confrontación			
	45 días	Control	10100 <sup>a</sup>	35.9 ± 1.6 <sup>a</sup>	-
		<i>C. tyrobutyricum</i> sólo	69500 <sup>b</sup>	30.6 ± 3.2 <sup>a</sup>	+
		Confrontación	29000 <sup>a</sup>	13.4 ± 1.4 <sup>b</sup>	-
	60 días	Control	10100 <sup>a</sup>	39.4 ± 9.3 <sup>a</sup>	-
		<i>C. tyrobutyricum</i> sólo	84000 <sup>b</sup>	58.0 ± 3.3 <sup>b</sup>	+
		Confrontación	36500 <sup>a</sup>	13.8 ± 1.6 <sup>c</sup>	-

\*<sup>1</sup> Los recuentos de NMP en el día 0 fueron determinados en la leche empleada en las elaboraciones queseras (esporas/L).

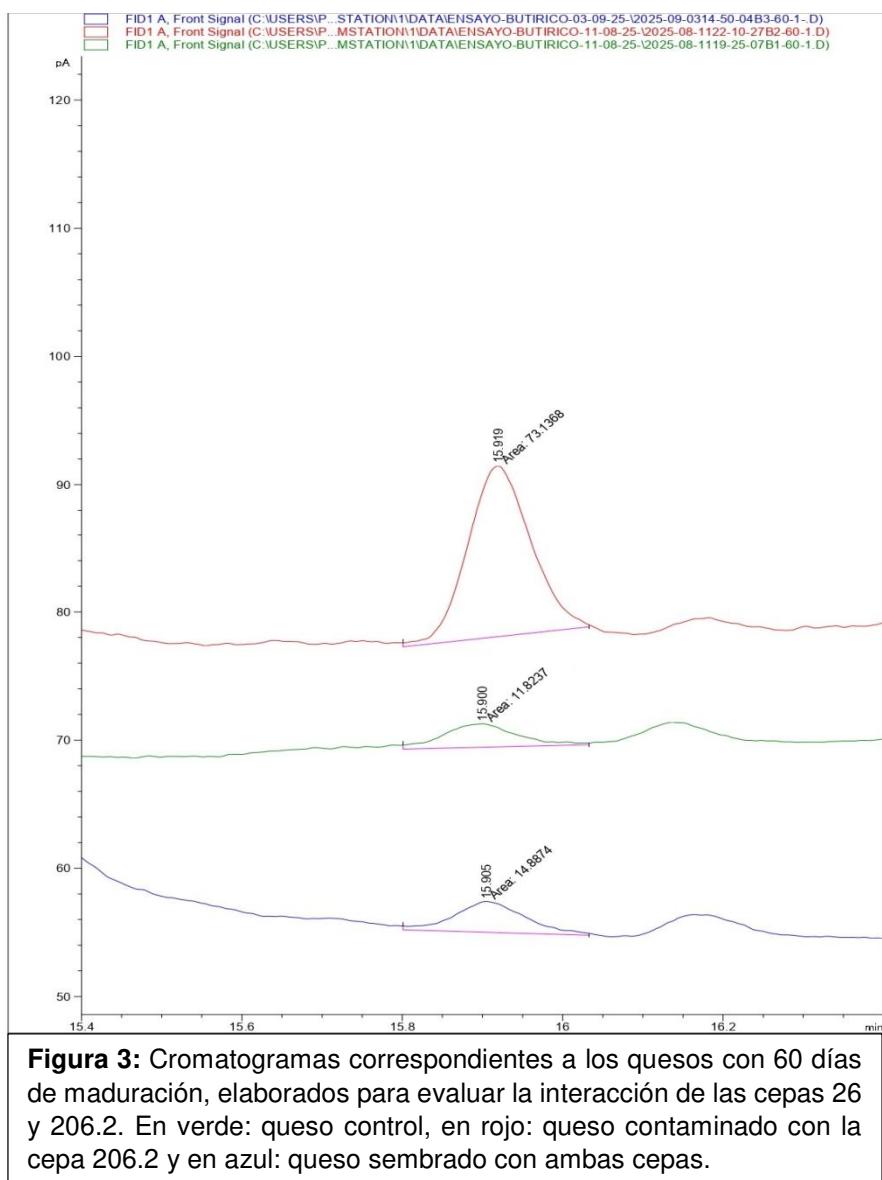
\*<sup>2</sup> ND: No determinado.



**Figura 2:** Quesos con signos de hinchazón tardía, contaminados con *C. tyrobutyricum*, sin adición de cepa anticlostridial. En a) y b) quesos con 60 días de maduración de la confrontación de la cepa 26 con las cepas 206.2 (a) y 206.6 (b). En c) y d) quesos correspondientes a la confrontación de las cepas 95 y 206.6 en los días 45 (c) y 60 (d) de maduración.

Con respecto a los valores de NMP de esporas clostridiales existentes en los quesos, los ensayos experimentales correspondientes a la interacción entre la cepa 26 y la cepa 206.6, así como los pertenecientes a la cepa 95 con las cepas 206.2 y 206.6, se detectaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) a los 45 y 60 días de maduración entre la condición de confrontación y los quesos a los cuales sólo se adicionó la suspensión de esporas (control positivo). En el caso de los ensayos experimentales realizados para evaluar la interacción de la cepa 26 con la cepa 206.2, sólo se detectó diferencia significativa entre las condiciones experimentales ya mencionadas a los 60 días de maduración. En todos los casos, los quesos correspondientes a los controles positivos presentaron valores de NMP superiores a los existentes en los quesos elaborados en la condición de confrontación. El NMP de esporas más bajo detectado en los quesos afectados por hinchazón tardía fue 27500 esporas/Kg. Es necesario indicar que no existe un valor mínimo de NMP de esporas clostridiales establecido para la ocurrencia de la alteración, porque varios factores influyen en su desarrollo. Algunos de estos factores son la(s) cepa(s) de *Clostridium* presente(s) en los quesos, el sinergismo entre diferentes especies de *Clostridium* y los parámetros fisicoquímicos que inciden las distintas etapas del proceso de elaboración quesera, entre ellos se encuentran la temperatura empleada en la cocción de la cuajada, el contenido de sal que debe adquirir el queso producido, el contenido de humedad de la variedad considerada, así como la temperatura y el tiempo de maduración (Ruusunen et al., 2012; Brändle et al., 2016; Podrzaj et al., 2020; Qian et al., 2022). Por la razón anterior, en la bibliografía se encuentran distintos valores mínimos de NMP de esporas clostridiales en quesos necesarios para el desarrollo del defecto, que se ubican en el rango de 50 a 10000 esporas/Kg (Burstcher et al., 2020; Morandi et al., 2022; Qian et al., 2022; Velasco et al., 2025).

Con respecto al contenido de ácido butírico en los quesos a los 45 y 60 días de maduración, en las tablas 3 y 4 puede observarse que la concentración del compuesto fue significativamente mayor en los quesos correspondientes al control positivo, que en los quesos en los cuales se confrontaron las cepas 26 y 95 con las cepas de *C. tyrobutyricum* ( $p < 0.05$ ). La figura 3 compara cromatogramas correspondientes a los quesos elaborados en el ensayo experimental entre las cepas 26 y 206.2, con 60 días de maduración.



Además de los parámetros evaluados, los quesos producidos fueron examinados en los tiempos mencionados para detectar posibles signos de hinchazón tardía. En el caso de los estudios realizados con la cepa 26, la alteración sólo fue detectada los 60 días de elaboración en los quesos que sólo contenían las esporas de las cepas 206.2 y 206.6 (figuras 2a y 2b). Dichos quesos presentaron concentraciones de 93.8 y 35.5 mg/Kg, respectivamente. En referencia a los ensayos experimentales hechos para evaluar la interacción entre la cepa 95 y la cepa 206.6, se observaron señales de hinchazón tardía a los 45 y 60 días de maduración en los quesos correspondientes a la cepa 206.6 sola (figuras 2c y 2d). Las concentraciones de ácido butírico en dichos quesos fueron 30.6 y 58.0 mg/Kg, respectivamente. En cuanto a los estudios efectuados para analizar la actividad anticlostridial de la cepa 95 contra la cepa 206.2, ninguno de los quesos presentó signos visibles del defecto.



Algunos trabajos científicos han intentado correlacionar la concentración mínima de ácido butírico en quesos con la ocurrencia de hinchazón tardía. Los valores críticos reportados en dichas investigaciones se encuentran en el rango de 100 - 400 mg/Kg (Garde et al., 2012; Lamichhane, 2019; Bonazza et al., 2025). En los quesos elaborados en este estudio, que presentaron el defecto, los niveles detectados de ácido butírico fueron menores a los valores antes mencionados. Sin embargo, el desarrollo de este defecto depende de varios factores, entre ellos el tipo de queso considerado, su tiempo y temperatura de maduración, así como la(s) cepa(s) de *Clostridium* presente(s) en el queso, puesto que la producción de ácido butírico es una propiedad cepa-dependiente. Otro aspecto a considerar es la posible ocurrencia de sinergismo entre especies distintas de *Clostridium* (Brändle et al., 2016; Podrzaj et al., 2020; Qian et al., 2022). También debe tenerse en cuenta que parte del ácido butírico no proviene de la fermentación ácido butírica, sino que se origina en el proceso de lipólisis durante la maduración quesera (Garde et al., 2012; Lamichhane, 2019). Además, la solubilidad de los gases CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>, que son los verdaderos responsables de los defectos visuales en la horma, depende del pH de la masa del queso, el contenido de sal en fase acuosa y la temperatura de maduración (Truong et al., 2017; Lamichhane, 2019; Lamichhane et al., 2021). De acuerdo a los resultados obtenidos para los parámetros evaluados en el estudio, las cepas 26 y 95 fueron capaces de inhibir el desarrollo de las cepas de *C. tyrobutyricum* empleadas en queso tipo Dambo durante los 60 días que duró el análisis, y prevenir la aparición del defecto de hinchazón tardía.

En los quesos producidos se analizó el contenido de proteína cruda y materia grasa en base seca, así como el contenido de humedad (materia seca) a los 45 y 60 días de maduración para determinar si dichos parámetros difirieron de lo estipulado en la reglamentación para el queso tipo Dambo. Debe aclararse que el reglamento vigente sólo define el rango porcentual de materia grasa y el porcentaje mínimo de materia seca que este producto debe tener. En cuanto a los niveles de proteína cruda tomados como referencia en este estudio, corresponden a los valores usualmente existentes en los quesos de masa semidura (Lynch et al., 2002; Bojanić-Rašović et al., 2013; Mamo et al., 2020; de Boer et al., 2025). Las tablas 5 y 6 muestran los datos determinados en el estudio. En base a los resultados obtenidos, en todas las elaboraciones realizadas los parámetros analizados a los 45 y 60 días presentaron valores acordes con los rangos de referencia. Estos resultados sugieren que el empleo de las cepas 26 y 95 como cultivos adjuntos en la producción de queso Dambo serían compatibles con las características fisicoquímicas del producto final.

**Tabla 5:** Análisis fisicoquímico de quesos tipo Dambo con 45 días de maduración, elaborados para evaluar la actividad anticlostridial de las cepas 26 y 95, contra las cepas 206.2 y 206.6 de *C. tyrobutyricum*.

Ensayo experimental	Condición experimental	% Materia grasa* (m/m)	% Materia seca mínimo (m/m)	% Proteína cruda* (m/m)
<b>26 vs. 206.2</b>	Control	52.14	71.55	36.70
	<i>C. tyrobutyricum</i> sólo	51.26	70.09	35.84
	Confrontación	46.02	71.44	37.79
<b>26 vs. 206.6</b>	Control	47.92	66.90	36.40
	<i>C. tyrobutyricum</i> sólo	44.59	67.88	36.43
	Confrontación	46.67	66.83	39.37
<b>95 vs. 206.2</b>	Control	48.93	68.17	36.86
	<i>C. tyrobutyricum</i> sólo	47.93	67.33	39.86
	Confrontación	48.75	67.68	37.07
<b>95 vs. 206.6</b>	Control	49.25	67.49	37.19
	<i>C. tyrobutyricum</i> sólo	44.73	65.74	36.34
	Confrontación	47.64	56.19	37.65
<b>Valores de referencia</b>		<b>45 - 55 %</b>	<b>50 - 52 %</b>	<b>35 - 45</b>
* Valores expresados en base seca.				

**Tabla 6:** Análisis fisicoquímico de quesos tipo Dambo con 60 días de maduración, elaborados para evaluar la actividad anticlostridial de las cepas 26 y 95, contra las cepas 206.2 y 206.6 de *C. tyrobutyricum*.

Ensayo experimental	Condición experimental	% Materia grasa* (m/m)	% Materia seca mínimo (m/m)	% Proteína cruda* (m/m)
<b>26 vs. 206.2</b>	Control	51.65	72.68	37.84
	<i>C. tyrobutyricum</i> sólo	53.06	70.70	36.16
	Confrontación	46.43	70.62	38.40
<b>26 vs. 206.6</b>	Control	48.29	71.38	36.45
	<i>C. tyrobutyricum</i> sólo	46.68	67.15	39.16
	Confrontación	45.92	67.15	39.85
<b>95 vs. 206.2</b>	Control	49.98	69.79	36.84
	<i>C. tyrobutyricum</i> sólo	48.74	67.55	40.18
	Confrontación	49.41	69.43	38.11
<b>95 vs. 206.6</b>	Control	51.00	71.91	37.85
	<i>C. tyrobutyricum</i> sólo	45.42	70.82	37.22
	Confrontación	48.14	66.96	38.19
<b>Valores de referencia</b>		<b>45 - 55 %</b>	<b>50 - 52 %</b>	<b>35 - 45</b>
* Valores expresados en base seca.				

#### 4. Conclusión

Los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos y fisicoquímicos realizados en queso tipo Dambo, para evaluar la actividad anticlostridial de las cepas 26 y 95 de *Lacticaseibacillus*, sugieren que el empleo de estas cepas como cultivos iniciadores adjuntos es adecuado para evitar el desarrollo de *C. tyrobutyricum* y prevenir la ocurrencia de hinchazón tardía, sin afectar las propiedades fisicoquímicas del producto final. Si bien *C. tyrobutyricum* es el principal causante de hinchazón tardía en queso, se considera necesario realizar futuros estudios sobre la actividad inhibitoria de las cepas 26 y 95 en queso, contra cepas de otras especies de *Clostridium* que también son causantes frecuentes del defecto. Asimismo, resultaría interesante efectuar estos estudios en otras variedades de quesos. En base a estas investigaciones será posible determinar el alcance del biocontrol ejercido por las cepas de *Lacticaseibacillus* contra *Clostridium* y definir su posible uso como cultivos iniciadores.

## 5. Bibliografía

Association of Analytical Communities (AOAC). (2023). Method 920.39: Fat (crude) or ether extract in animal feed. In Official Methods of Analysis of AOAC International (22nd. ed.).

Association of Analytical Communities (AOAC). (2023). Method 930.15: Moisture in animal feed. In Official Methods of Analysis of AOAC International (22nd. ed.).

Association of Analytical Communities (AOAC). (2023). Method 984.13: Protein (crude) in animal feed and pet food. Copper catalyst Kjeldahl method. In Official Methods of Analysis of AOAC International (22nd. ed.).

Bezerra, D.A.F.V.A., Souza, K.M.S., Sales, D.C., Araújo, E.O.M., Urbano, S.A., Cipolat-Gotet, C., Anaya, K., Ribeiro, C.V.D.M., Porto, A.L.F., & Rangel, A.H.N. (2024). Effect of ripening time on the content of bioactive peptides and fatty acids profile of Artisanal Coalho cheese. PLOS ONE, Vol. 19, No. 7, e0306552. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0306552>

Bintsis, T., & Papademas, P. (2024). The application of protective cultures in cheese: a review. Fermentation, Vol. 10, No. 3, 117. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation10030117>

Bojanić-Rasovic, M., Nikolic, N., Martinovic, A., Katic, V., Rasovic, R., Walzer, M., & Domig, K. (2013). Correlation between protein to fat ratio of milk and chemical parameters and the yield of semi-hard cheese. Biotehnologija u Stocarstvu, Vol. 29, No. 1, 145 - 159. DOI: <https://doi.org/10.2298/bah1301145b>

Bonazza, F., Morandi, S., Silvetti, T., Tamburini, A., De Noni, I., Masotti, F., & Brasca, M. (2025). Effects of protective Lacticaseibacillus casei VC201 culture on late blowing prevention, lipid profile, and sensory characteristics of Valtellina Casera PDO cheese during ripening. Foods, Vol. 14, No. 14, 2433. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods14142433>

Brändle, J., Domig, K.J., & Kneifel, W. (2016). Relevance and analysis of butyric acid producing clostridia in milk and cheese. Food Control, Vol. 67, 96 - 113. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.038>

Ceruti, R. J., Zorrilla, S.E., Sabbag, N.G., Costa, S.C., & Sihufe, G.A. (2014). Acceleration of Reggianito cheese ripening. Effect of increased initial ripening temperatures on biochemical and sensory characteristics. Dairy Science & Technology, Vol. 95, No. 2, 231 - 243. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0205-2>

Comisión del *Codex Alimentarius*. (2022). Norma del *Codex* para el Danbo. *Codex* Stan 264-1966. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/cxs264-1966/es/>

Comisión Europea. (2017). Reglamento de ejecución (UE) 2017/1901 de la Comisión. Diario Oficial de la Unión Europea, L269, 10 - 12.

de Boer, J., Goldschmidt, B., Boom, R., van der Linden, E., Landman, J., & Diedericks, C.F. (2025). Universal compression behaviour of semi-hard cheeses: A basis for designing plant-based cheese alternatives?. *Food Hydrocolloids*, Vol. 165, 111246. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2025.111246>

Escobar, D., Pelaggio, R., Grille, L., Colzada, E., Rampoldi, C., Carro, S., Delucchi, I., Viola, N., Nolla, J.P., Reinares, R., Chilbroste, P., y Piedrabuena, L. (2014). Efecto del perfil de caseínas, recuento de células somáticas y composición de la leche en el rendimiento del queso Dambo. *Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay, INNOTEC*, Vol. 9, 31 - 42. DOI: <https://doi.org/10.26461/09.05>

Falchi, L., Pistón, M., Casarotto, G., Carro, S., Cajarville, C., & laquinta, F. (2023). Development of a green methodology for the determination of artisanal Danbo cheese quality parameters. *Brazilian Journal of Analytical Chemistry*, Vol. 10, No. 41, 30 - 41. DOI: <https://doi.org/10.30744/brjac.2179-3425.ar-21-2023>

Food and Agriculture Organization (FAO). (2013). *Codex general standard for cheese. Codex Stan 283-1978*. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/list-standards/en/>

Fox, P.F. Guinee, T.P., Cogan, T.M., & McSweeney, P.L.H. (2017). Microbiology of cheese ripening (Chapter 11). In P.F. Fox (Ed.), *Fundamentals of cheese science* (1st. Ed., pp. 333 - 390). Springer New York. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_11)

Garde, S., Ávila, M., Arias, R., & Núñez, M. (2012). Sugars and organic acids in raw and pasteurized milk Manchego cheeses with different degrees of late blowing defect. *International Dairy Journal*, Vol. 25, No. 2, 87 - 91. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.01.005>

Goy, D., Häni, J.-P., Piccinali, P., Wehrmüller, K., Jakob, E., & Frölich-Wyder, M.-T. (2012). Salt and its significance in cheese making. *AALP forum* No 59.

Giroux, H.J., Lemaire, N., & Britten, M. (2022). Effect of cheese composition and cheese-making conditions on salt and moisture transfer during brining. *International Dairy Journal*, Vol. 129, No. 105325. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105325>

Hassan, H., St-Gelais, D., Gomaa, A., & Fliss, I. (2021). Impact of Nisin and Nisin-producing *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* on *Clostridium tyrobutyricum* and bacterial ecosystem of cheese matrices. *Foods*, Vol. 10, No. 4, 898. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10040898>

Johnson, M., & Law, B.A. (2010). The origins, development and basic operations of cheesemaking technology (Chapter 2). In B.A. Law, & A.Y. Tamime (Eds.), *Technology of cheesemaking* (2nd. ed., pp. 68 - 97). Blackwell Publishing Ltd. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781444323740.ch2>

Khattab, A.R., Guirguis, H.A., Tawfik, S.M., & Farag, M.A. (2019). Cheese ripening: a review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment. Trends in Food Science & Technology, Vol. 88, 343 - 360. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.009>

Kindstedt, P.S. (2013). The basics of cheesemaking. Microbiology Spectrum, Vol. 1, No. 1, CM-0002-2012. DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.CM-0002-2012>

Lamichhane, P. (2019). Influence of milk pre-treatment, and changes in cheese structure and carbon dioxide solubility on the development of split defects in cheese. [PhD dissertation, University College Cork]. CORA. <https://hdl.handle.net/10468/9563>

Lamichhane, P., Sharma, P., Kelly, A.L., Risbo, J., Rattray, F.P., & Sheehan, J.J. (2021). Solubility of carbon dioxide in renneted casein matrices: Effect of pH, salt, temperature, partial pressure, and moisture to protein ratio. Food Chemistry, Vol. 336, 127625. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127625>

López González, N., Abarquero, D., Combarros-Fuertes, P., Prieto, B., Fresno, J. M., & Tornadijo, M. E. (2024). Influence of salting on physicochemical and sensory parameters of blue-veined cheeses. Dairy, Vol. 5, No. 1, 93 - 105. DOI: <https://doi.org/10.3390/dairy5010008>

Lynch, J.M., Barbano, D.M., & Fleming, J.R. (2002). Determination of the total nitrogen content of hard, semihard, and processed cheese by the Kjeldahl method: collaborative study. Journal of AOAC International, Vol. 85, No. 2, 445 - 455. DOI: <https://doi.org/10.1093/jaoac/85.2.445>

Mamo, J., Getachew, P., Samuel Kuria, M., & Assefa, F. (2020). Application of milk-clotting protease from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 MN726447 and *Bacillus subtilis* SMDFS 2B MN715837 for Danbo cheese production. Journal of Food Quality, Vol. 2020, 8869010. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/8869010>

Mercado Común del Sur (MERCOSUR). (2011). Reglamento técnico MERCOSUR de identidad y calidad del queso Danbo. MERCOSUR/GMC/RES N° 29/96. <https://normas.mercosur.int/public/normativas/1932>

Morandi, S., Silveti, T., & Brasca, M. (2022). Content and spatial distribution of dairy-related *Clostridium* spores in Grana Padano cheese during the ripening period. LWT - Food Science and Technology, Vol. 167, 113850. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113850>

Mukhiddinov, Q.A., Rakhimov, A.M., Saparov, D.E., Aït-Kaddour, A., & Sultanova, S.A. (2022). Investigation of the process of molding, pressing and salting hard and soft cheeses. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Vol. 1076, No. 1, 012060. DOI: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1076/1/012060>

Nalepa, B., Olszewska, M.A., & Markiewicz, L.H. (2018). Seasonal variances in bacterial microbiota and volatile organic compounds in raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 267, 70 - 76. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.024>

Panizzolo, L.A., Araújo, A.C., Taroco, L.V., Rodríguez, A., y Schöpf, G. (2011). Evolución de la proteólisis durante la maduración de quesos Danbo elaborados con distintos cultivos iniciadores. *Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay, INNOTECH*, No. 6, 24 - 27. DOI: <https://doi.org/10.26461/06.05>

Podrzaj, L., Burtscher, J., Küller, F., & Domig, K.J. (2020). Strain-dependent cheese spoilage potential of *Clostridium tyrobutyricum*. *Microorganisms*, Vol. 8, No. 11, 1836. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111836>

Qian, C., Martin, N.H., Wiedmann, M., & Trmčić, A. (2022). Development of a risk assessment model to predict the occurrence of late blowing defect in Gouda cheese and evaluate potential intervention strategies. *Journal of Dairy Science*, Vol. 105, No. 4, 2880 - 2894. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21206>

Rosero Lomas, Á.M., y Guacales Gualavisi. (2013). Estudio de factibilidad para la producción y comercialización de quesos maduros y semimaduros en la provincia del Carchi sector El Carmelo. [Tesis de Grado, Universidad Técnica del Norte]. Repositorio UTN. <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/2269>

Ruusunen, M., Surakka, A., Korkeala, H., & Lindström, M. (2012). *Clostridium tyrobutyricum* strains show wide variation in growth at different NaCl, pH, and temperature conditions. *Journal of Food Protection*, Vol. 75, No. 10, 1791 - 1795. DOI: <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-12-109>

Sánchez, C., Garde, S., Landete, J.M., Calzada, J., Baker, D.J., Evans, R., Narbad, A., Mayer, M.J., & Ávila, M. (2024). Identification, activity and delivery of new LysFA67 endolysin to target cheese spoilage *Clostridium tyrobutyricum*. *Food Microbiology*, Vol. 117, 104401. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104401>

Şatana, E. (2018). Preparation, production and industrial application of cheese protective cultures. [PhD dissertation, İzmir Institute of Technology]. GCRIS Repository. <https://hdl.handle.net/11147/7171>

Shi, C., & Maktabdar, M. (2022). Lactic acid bacteria as biopreservation against spoilage molds in dairy products - A review. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 12, 819684. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.819684>

Silvetti, T., Morandi, S., & Brasca, M. (2018). Growth factors affecting gas production and reduction potential of vegetative cell and spore inocula of dairy-related *Clostridium* species. *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 92, 32 - 39. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.014>



Sørensen, J., & Benfeldt, C. (2001). Comparison of ripening characteristics of Danbo cheeses from two dairies. *International Dairy Journal*, Vol. 11, 355 - 362. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(01\)00064-4](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(01)00064-4)

Touraille, C., & Bèrgere, J.L. (1974). La germination de la spore de *Clostridium tyrobutyricum*. *Biochimie*, Vol. 56, 404 - 422.

Truong, T., Palmer, M., Bansal, N., & Bhandari, B. (2017). Investigation of solubility of carbon dioxide in anhydrous milk fat by lab-scale manometric method. *Food Chemistry*, Vol. 237, 667 - 676. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.141>

Velasco, R., Cabeza, M.C., & Ordóñez, J.A. (2025). Current approaches to minimize the late blowing defect of cheese. *Cogens Food & Agriculture*, Vol. 11, No. 1, 2460462. DOI: <https://doi.org/10.1080/23311932.2025.2460462>

Zhao, S., Tadesse, B.T., Gu, L., & Solem, C. (2025). Cheese production revisited - Novel and overlooked strategies for improving efficiency and sustainability of cheese manufacturing. *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 164, 105213. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2025.105213>

Zeppa, G., Conterno, L., & Gerbi, V. (2001). Determination of organic acids, sugars, diacetyl, and acetoin in cheese by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 49, No. 6, 2722 - 2726. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf0009403>

## Capítulo IV. Identificación y análisis genómico de las cepas 26 y 95

### 1. Introducción

La selección de cepas microbianas para su empleo como cultivos iniciadores en la elaboración de productos alimentarios, no sólo se basa en su caracterización a nivel tecnológico, también debe asegurarse que dichas cepas tengan status GRAS (*Generally Recognized As Safe*), es decir, no representan un riesgo para la salud del consumidor (García-Díez y Saraiva, 2021; Souza et al., 2022; Rossi, 2023). En este sentido, la identificación en forma inequívoca de las cepas a nivel de especie o subespecie, es un requisito indispensable al evaluar su inocuidad (Costa et al., 2022; Souza et al., 2022).

En muchos géneros bacterianos la identificación de las cepas puede lograrse mediante análisis fenotípico, a través de pruebas bioquímicas, morfológicas y fisiológicas, y/o empleando técnicas de análisis genotípico, como son la secuenciación del gen del ARNr 16S o de la región ITS del ARNr 16S-23S, análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA), polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y la hibridación ADN-ADN (Sabat et al., 2017; Huang et al., 2018; Kim et al., 2021a,b; Laref y Belkheir, 2022; Stoppani et al., 2023). Sin embargo, los métodos mencionados tienen baja capacidad de discriminación entre especies del género *Lactocaseibacillus*, a causa de la elevada similitud de sus secuencias genómicas (Huang et al., 2018; Grujović et al., 2022; Torres-Miranda et al., 2022; Grabner et al., 2023). Las técnicas moleculares que resultan más efectivas para identificar a los miembros de este género bacteriano son el análisis de secuencias multilocus (MLSA) de varios genes esenciales y conservados (genes housekeeping), y la secuenciación del genoma completo (WGS) y su posterior análisis bioinformático (Huang et al., 2018; Lau et al., 2018; Kim et al., 2022; Grabner et al., 2023). Cabe indicar que la técnica WGS consigue una mayor resolución taxonómica que el estudio por MLSA, porque considera todo el genoma del microorganismo en lugar de algunos genes. En consecuencia, la identificación es más precisa (Huang et al., 2018; Jensen et al., 2021; Wittouck, 2021; Garavaglia et al., 2023).

Un aspecto a destacar del análisis genómico completo su enorme potencial para la caracterización integral de los microorganismos. Esta herramienta no solo permite identificar taxonómicamente una cepa, sino también explorar en profundidad su repertorio genético mediante estudios de anotación de genes. Dichos análisis posibilitan la detección de elementos genéticos de interés, como genes de resistencia a antibióticos, plásmidos, profagos y genes involucrados en la biosíntesis de bacteriocinas (Kim et al., 2021b; Grujović et al., 2022; Torres-Miranda et al., 2022; You et al., 2023). En el contexto de la biotecnología alimentaria, los datos obtenidos a partir del análisis genómico resultan fundamentales para determinar la inocuidad, estabilidad genómica y desempeño funcional de las cepas utilizadas como cultivos iniciadores o complementarios. Con respecto a este punto, la detección de genes de resistencia a antibióticos en el genoma bacteriano podría suponer un riesgo para la salud pública, por la posibilidad de su transferencia mediante plásmidos o transposones a

microorganismos patógenos existentes en la leche o el queso (Chen et al., 2024; Floris et al., 2025). Por otro lado, los profagos impactan negativamente en la producción de alimentos fermentados, porque al ingresar en el ciclo de proliferación lítica, provocan la muerte de las células infectadas. En consecuencia, hay una menor carga de células viables capaces de llevar a cabo los procesos metabólicos deseados, lo que puede afectar la calidad del producto final y el rendimiento productivo (Fernández et al., 2017; Jarocki et al., 2023). Por otra parte, la detección de genes asociados a la biosíntesis de bacteriocinas constituye un aporte de alto valor, ya que complementa la caracterización fisicoquímica y funcional de los compuestos peptídicos antimicrobianos. La identificación in silico de estos genes no solo permite corroborar la producción de bacteriocinas previamente detectada experimentalmente, sino también predecir la existencia de nuevas moléculas con potencial actividad antimicrobiana. De este modo, el estudio genómico amplía significativamente la comprensión del potencial bioprotector de una cepa, y proporciona una perspectiva más completa sobre su rango de acción y su potencial aplicación biotecnológica (Cañaveral Sánchez et al., 2022; Queiroz et al., 2022; Zhang et al., 2025).

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos del análisis de secuenciación del genoma completo de las cepas 26 y 95 de *Lacticaseibacillus*. Los análisis realizados tuvieron por objetivo identificar a nivel de especie a dichas cepas, así como detectar posibles genes de resistencia a antibióticos, plásmidos, profagos y genes asociados a la biosíntesis de bacteriocinas.

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1 Extracción de ADN genómico**

Las cepas 26 y 95 fueron crecidas en caldo MRS a 37 °C durante 24 h. Los cultivos resultantes se centrifugaron a 10000 rpm por 5 min. para obtener los pellets. Éstos fueron resuspendidos en 200 µL de buffer TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) y a partir de ellos se extrajeron los ADN bacterianos con el kit comercial GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza de los ADN extraídos fueron evaluadas en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Quigley et al., 2012; Rodrigues, 2016).

### **2.2 Secuenciación de los genomas bacterianos y análisis bioinformático**

Los ADN bacterianos fueron secuenciados por MacroGen Korea (Seúl, Corea del Sur) mediante la plataforma Illumina HiSeq con lecturas pareadas de 151 pb, utilizando la librería TruSeq Nano DNA (350). Los reads resultantes fueron filtrados con la herramienta Fastp (v. 0.12.0), aplicando un umbral de calidad Phred  $\geq 20$  y una longitud mínima de 30 pb (Chen et al., 2018). Además, se eliminaron de los reads las secuencias PolyG y PoliX superiores a 10 pb. Los genomas bacterianos fueron ensamblados con el algoritmo SPAdes (v. 3.15.3) considerando contigs de longitud  $\geq 1000$  pb (Prjibelski et al., 2020). La calidad de los ensamblados producidos se evaluó con las herramientas QUAST (v. 5.3.0) (Gurevich et al., 2013), y BUSCO (v. 5.13) empleando el predictor Prodigal para

la detección de genes ortólogos de copia única altamente conservados (Manni et al., 2021). La identificación de las cepas a nivel de especie se realizó comparando las secuencias de los genomas ensamblados con las secuencias genómicas de las cepas de referencia *L. casei* ATCC 393, *L. paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2, *L. rhamnosus* 1.0320, *L. zeae* subsp. *silagei* NCIMB 15474, disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/>).

La anotación general de los genomas ensamblados se realizó con la herramienta Bakta (v. 1.9.4) (Schwengers et al., 2021). Empleando la herramienta EggNOG (v. 5.0), se identificaron las proteínas ortólogas codificadas y éstas fueron agrupadas en familias evolutivamente conservadas para predecir su función (Cantalapiedra et al., 2021). El análisis de genes de resistencia a antibióticos y compuestos desinfectantes (genes AMR) se realizó con las herramientas AMRFinderPlus (v. 4.0.23), ResFinder (v. 4.7.2) (<https://genepi.food.dtu.dk/resfinder>) y Resistance Gene Identifier (RGI) (v. 6.0.5) (<https://card.mcmaster.ca/analyze/rqi>) (Camacho et al., 2009; McArthur et al., 2013; Feldgarden et al., 2019; Bortolaia et al., 2020). En los genomas también se buscaron determinantes génicos para factores de virulencia, empleando la plataforma VirulenceFinder 2.0 (v. 2.0.5) (Camacho et al., 2009; Clausen et al., 2018). Además, se predijo el grado de patogenicidad con la herramienta PathogenFinder2 (v. 0.5.0) (Ferrer Florensa et al., 2025). La presencia de plásmidos en los genomas se analizó con la herramienta PLSDB (v. 2024.05.31.v2) (<https://ccb-microbe.cs.uni-saarland.de/plsdb2025/search>) (Galata et al., 2019). La base de datos BAGEL4 (<http://bagel4.molgenrug.nl/>) se utilizó para identificar genes codificantes de bacteriocinas (van Heel et al., 2018). La detección de profagos en los genomas bacterianos se realizó con la herramienta Phastest (v. 3.0) (<https://phastest.ca/>) (Zhou et al., 2011; Arndt et al., 2016; Wishart et al., 2023).

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1 Secuenciación de los genomas bacterianos y análisis bioinformático

Uno de los requisitos para que una cepa pueda ser empleada en la elaboración de productos alimentarios es conocer su identidad. En el contexto de la tesis de Maestría (Olivera Rodi, 2018), las cepas 26 y 95 fueron identificadas mediante la técnica de secuenciación del gel del ARNr 16S, como pertenecientes al género *Lactocaseibacillus*. Sin embargo, la técnica mencionada no logró discriminar entre las especies que presentaron mayor porcentaje de identidad, éstas fueron *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* y *L. zeae*. Dicha limitación se debe a la elevada similitud que presenta el gen considerado entre dichas especies bacterianas. Con el fin de identificar las cepas 26 y 95 a nivel de especie, se decidió secuenciar sus genomas completos y compararlos con las secuencias de cepas de referencia de las especies antes mencionadas. La tabla 1 muestra las principales métricas analizadas por QUAST y BUSCO para evaluar la calidad estructural de los genomas ensamblados de estas cepas. Como puede apreciarse en la tabla, los genomas analizados presentaron valores de cobertura N50 y N90 elevados. En ambos casos, el contig más largo tuvo una longitud

adecuada y el porcentaje de pares apareados fue alto. Por otra parte, todos los genes analizados por la herramienta BUSCO fueron encontrados. Además, se detectaron bajos números de genes fragmentados y duplicados. En resumen, la calidad estructural de los ensamblados genómicos resultantes fue adecuada para realizar el análisis de identificación de las cepas, y los estudios de anotación de genes.

<b>Tabla 1:</b> Métricas de calidad de los ensamblados genómicos obtenidos para las cepas 26 y 95 de <i>Lacticaseibacillus</i> .		
<b>Métricas</b>	<b>Cepa 26</b>	<b>Cepa 95</b>
No. de contigs totales	18	139
No. de contigs $\geq 1000$ pb	18	139
Contig más largo	761563 pb	278411 pb
Longitud total*	3005582 pb	2888886 pb
%GC	47.94 %	46.28 %
N50	404240	44030
L50	3	19
N90	87975	10270
L90	9	70
% Pares apareados correctamente	99.15 %	93.78 %
Genes totales	402	402
Genes completos y de copia única	397	398
Genes completos y duplicados	2	2
Genes fragmentados	3	2
Genes faltantes	0	0
*: longitud total del genoma bacteriano considerando contigs $\geq 1000$ pb.		

Con respecto al análisis realizado para identificar las cepas anticlostridiales, las tablas 2 y 3 resumen los parámetros evaluados con la herramienta QUAST al comparar las secuencias de los genomas ensamblados, con las correspondientes a las cepas de referencia consideradas. La identificación se basó en la similitud del contenido de GC entre los genomas comparados, y en los valores más altos de cobertura y alineamiento respecto a los genomas de referencia. Siguiendo dicho criterio, la cepa 26 fue identificada como un aislamiento de *L. zeae* subsp. *silagei*, mientras que la identidad de la cepa 95 correspondió a *L. paracasei* subsp. *paracasei*. Estas especies forman parte de

la comunidad microbiana de la leche cruda y productos lácteos elaborados a partir de ésta (Výrostková et al., 2020; Kim et al., 2021b; Cardinali et al., 2025).

**Tabla 2:** Parámetros evaluados al comparar la secuencia del genoma ensamblado de la cepa 26 con las secuencias de los genomas de cepas de referencia de especies y subespecies de *Lacticaseibacillus*.

Cepa de referencia	%GC referencia*	Reads mapeados (%)	Pares mapeados correctamente (%)	Cobertura media	Cobertura $\geq 1x$ (%)
<i>L. casei</i> ATCC 393	47.88	80.41	75.59	826	81.29
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 8700:2	46.30	24.7	18.53	159	36.23
<i>L. rhamnosus</i> 1.0320	46.75	34.09	27.23	241	44.29
<i>L. zeae</i> subsp. <i>silagei</i> 15474	48.03	90.24	85.28	893	87.90

\*: el contenido de GC en el genoma ensamblado es 47.94 %.

**Tabla 3:** Parámetros evaluados al comparar la secuencia del genoma ensamblado de la cepa 95 con las secuencias de los genomas de cepas de referencia de especies y subespecies de *Lacticaseibacillus*.

Cepa de referencia	%GC referencia*	Reads mapeados (%)	Pares mapeados correctamente (%)	Cobertura media	Cobertura $\geq 1x$ (%)
<i>L. casei</i> ATCC 393	47.88	27.63	21.04	228	35.13
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 8700:2	46.30	78.05	73.94	874	83.42
<i>L. rhamnosus</i> 1.0320	46.75	21.05	16.20	158	32.32
<i>L. zeae</i> subsp. <i>silagei</i> 15474	48.03	23.83	18.23	180	32.12

\*: el contenido de GC en el genoma ensamblado es 46.28 %.

La anotación inicial de los genomas ensamblados consistió en detectar genes estructurales y funcionales básicos con la herramienta Bakta. La tabla 4 indica la cantidad de cada tipo de elemento genético identificado en los genomas.

**Tabla 4:** Anotación general de genes detectados en los genomas de las cepas 26 y 95.

Elemento genético	Cepa 26	Cepa 95
ARNt	53	54
ARNtm	1	1
ARNr	5	5
ARNnc	6	7
Regiones ARNnc	22	24
Arreglos CRISPR	0	0
CDSs	2740	2846
Pseudogenes	4	25
Genes hipotéticos	96	93
Péptidos Señal	0	0
sORFs	2	11
Gaps	0	0
OriCs	1	4
OriVs	0	0
OriTs	0	0

El algoritmo EggNOG permitió identificar las posibles proteínas funcionales ortólogas codificadas por los genomas, las cuales fueron agrupadas en categorías funcionales COG (Clusters of Orthologous Groups). En el caso de la cepa 26, el análisis predijo 2590 proteínas, de éstas 2322 fueron agrupadas en 47 categorías COG, mientras que 268 no pudieron ser clasificadas porque sus funciones son desconocidas y/o se trata de proteínas hipotéticas. En cuanto a la cepa 95, se encontraron 2625 proteínas posibles, de las cuales 2324 se agruparon en 51 categorías COG. Las proteínas restantes no pudieron ser asignadas a ninguna de las categorías funcionales por las mismas razones mencionadas para el genoma de la cepa 26. Es importante señalar que las proteínas hipotéticas con función de defensa, que se clasifican en la categoría COG “V”, fueron 83 y 98 para las cepas 26 y 95, respectivamente. En el anexo IV se detallan los resultados de los análisis realizados.

Empleando herramientas bioinformáticas específicas, los genomas ensamblados de las cepas 26 y 95 fueron analizados para identificar genes AMR, factores de virulencia, plásmidos, profagos y bacteriocinas. Los datos obtenidos en los análisis realizados se presentan en la tabla 5. No se detectaron genes AMR en los genomas bacterianos con ninguna de los tres softwares empleados, considerando un porcentaje de identidad  $\geq 85$  % y una longitud mínima de cobertura de 60 % con las secuencias de las bases de datos respectivas. Estos resultados sugieren que las cepas 26 y 95 no contienen genes de resistencia a compuestos antimicrobianos capaces de transferirse a otros microorganismos. Por otra parte, no se encontraron elementos genéticos asociados a factores de virulencia, lo que también hace suponer que las cepas 26 y 95 serían seguras para el ser humano. Estudios realizados por otros investigadores con cepas de *Lactocaseibacillus paracasei* han reportado resistencia a vancomicina, kanamicina, ciprofloxacina, norfloxacina, eritromicina, cloranfenicol, estreptomycin, amikacina, ertapenem, meropenem, cefazolina, cefoperazona, ofloxacina, ceftazidime, ceftriaxona, cefepim y tobramicina (Anisimova et al., 2022; Colautti et al., 2024; Sidthipol et al., 2025). Con respecto a la resistencia a compuestos antimicrobianos en cepas de *Lactocaseibacillus zeae*, existen pocos estudios disponibles. Sólo uno de las investigaciones existentes detectó cepas de *L. zeae* resistentes a los antibióticos ampicilina, clindamicina y eritromicina (Výrostková et al., 2020), los restantes trabajos científicos no hallaron cepas resistentes a los antibióticos considerados (Inayah et al., 2022; Kim et al., 2022; Colautti et al., 2024). Finalmente, con la herramienta PhatogenFinder2 se predijo la capacidad patogénica bacteriana de ambas cepas. En ambos casos la probabilidad fue baja, 5.07 % para la cepa 26 y 4.02 % para la cepa 95. Si bien estos hallazgos son prometedores, su confirmación necesita de evidencias producidas en estudios experimentales. La importancia de los distintos análisis antes descritos radica en que, si bien las BAL son reconocidas como GRAS, se han reportado casos de endocarditis y bacteriemias en personas inmunodeficientes, asociadas a cepas específicas de *Lactocaseibacillus* (Colautti et al., 2023, 2024), en consecuencia, es esencial evaluar la seguridad de cualquier cepa que se busque emplear en la elaboración de productos alimentarios.

En cuanto a la búsqueda de plásmidos en los genomas, en el caso de la cepa 95 se identificaron dos plásmidos, pLJ42 (NC\_019219.1) y pLPZ3



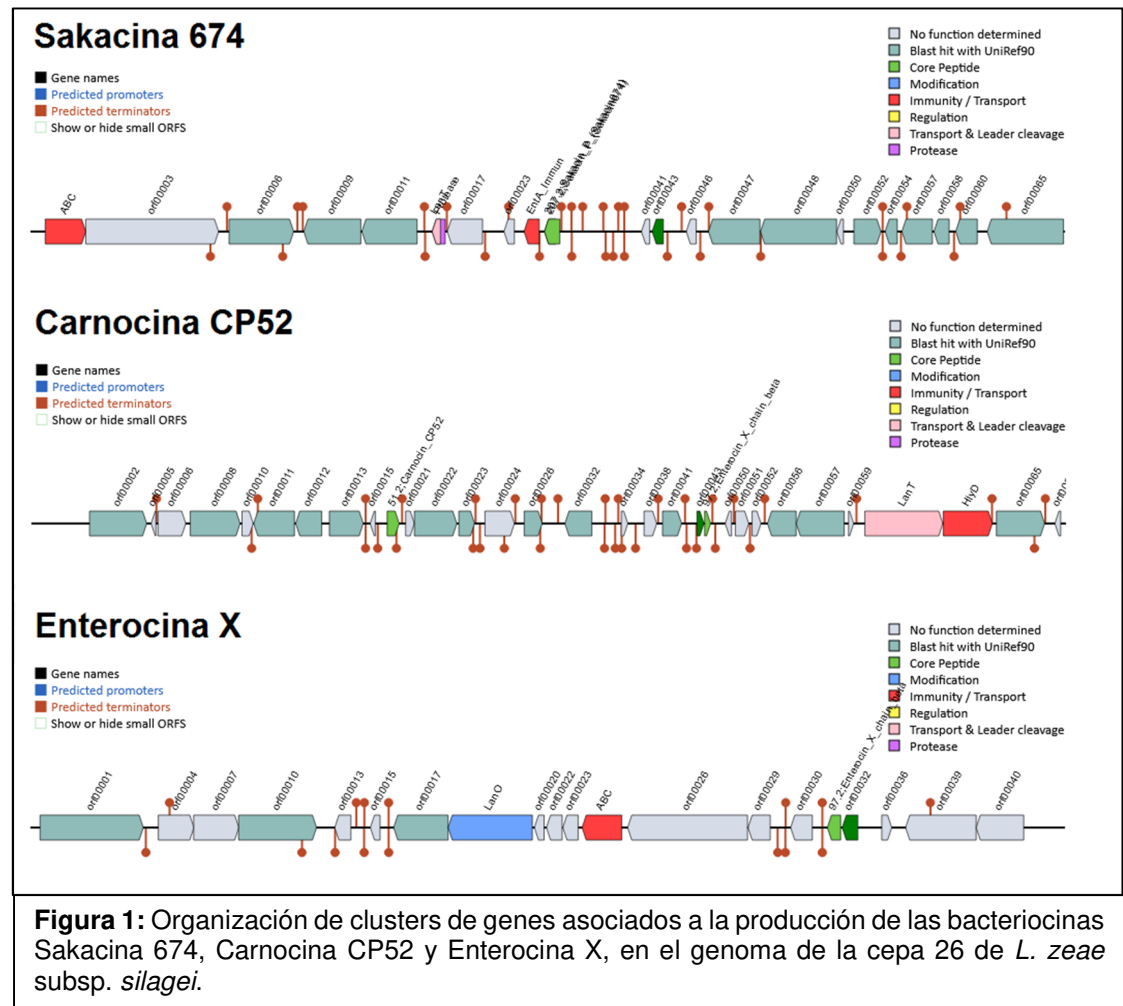
(NZ\_CP065157.1). Con respecto a la cepa 26, no se evidenciaron plásmidos presentes en su genoma. Estos resultados están en concordancia con otros estudios realizados en cepas de *Lacticaseibacillus* que indican una baja o nula presencia de plásmidos integrados en sus genomas bacterianos (Biswas y Biswas, 2016; Kiouisi et al., 2022; Torres-Miranda et al., 2022; Zhao et al., 2023; Kandasamy et al., 2024).

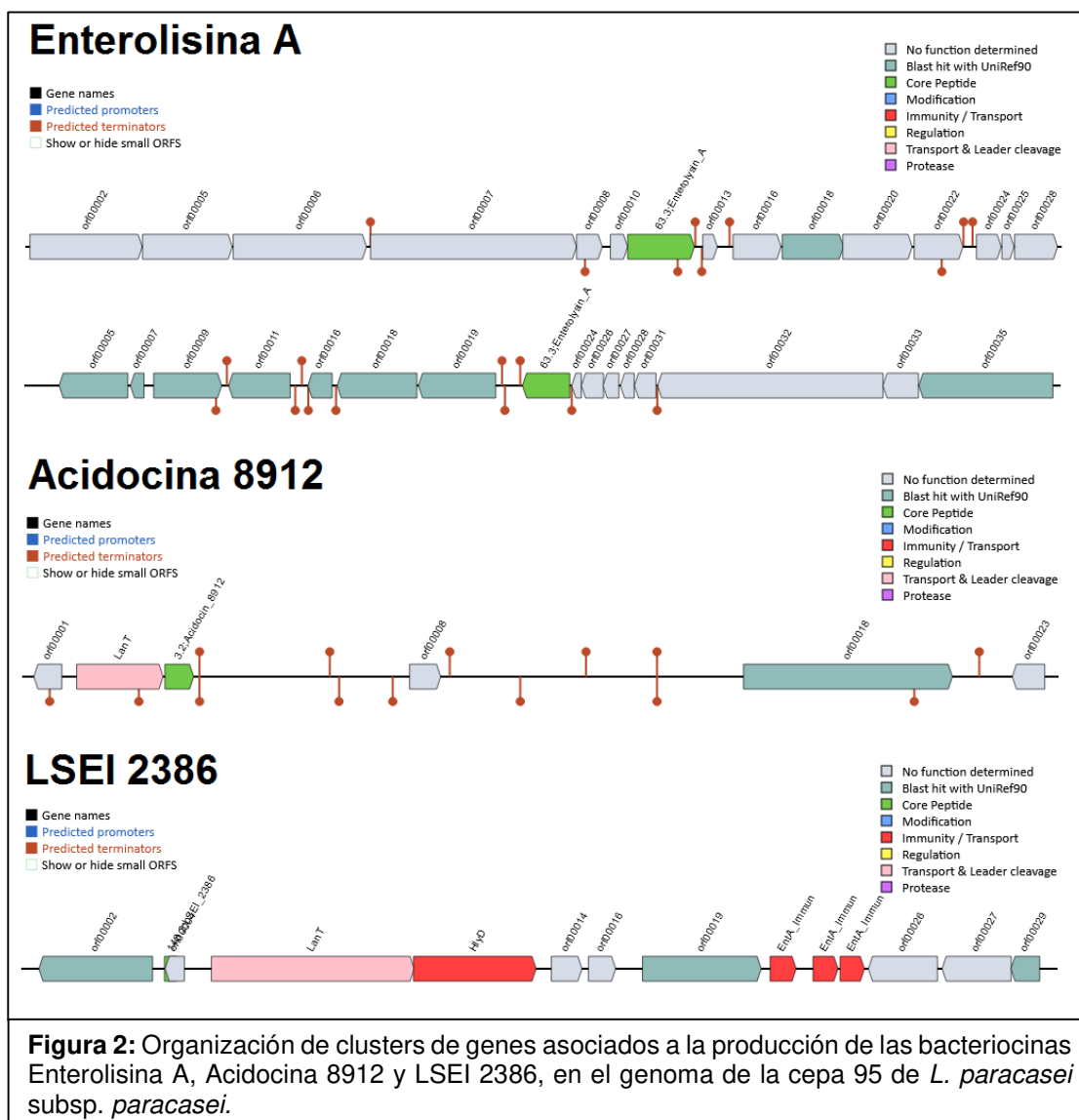
Por otra parte, en los genomas de ambas cepas se detectaron profagos. Este hallazgo supone un posible impacto negativo para el uso biotecnológico de dichas cepas, porque los profagos pueden activar su proliferación por ciclo lítico, provocando la lisis de las células bacterianas infectadas. En consecuencia, el número de células viables será menor y por lo tanto los compuestos anticlostidiales producidos alcanzarán concentraciones más bajas en la matriz del queso, resultando menos efectivos (Fernández et al., 2017; Jarocki et al., 2023; Shao et al., 2023; Racioppo et al., 2025).

<b>Tabla 5:</b> Número de genes codificantes para resistencia a compuestos antimicrobianos (genes AMR), factores de virulencia, plásmidos, profagos y bacteriocinas, detectados en los genomas de las cepas 26 y 95.		
<b>Elementos genéticos</b>	<b>Cepa 26</b>	<b>Cepa 95</b>
<b>Genes AMR</b>	0	0
<b>Factores de virulencia</b>	0	0
<b>Plásmidos</b>	0	2
<b>Profagos</b>	2	1
<b>Bacteriocinas</b>	3	3

En los genomas de las cepas 26 y 95 también se localizaron regiones potencialmente codificantes para bacteriocinas. En las figuras 1 y 2 se representa la arquitectura genómica de los clusters de los genes hallados y el alineamiento entre las secuencias de aminoácidos de las bacteriocinas predichas y las secuencias de las bacteriocinas homólogas encontradas en la base de datos Bagel4. En el caso de la cepa 26 (figura 1), los genes precursores de los péptidos antibacterianos fueron detectados en tres regiones genómicas, y presentaron homología con las bacteriocinas: Sakacina 674, Carnocina CP52 y la cadena beta de la Enterocina X. La Sakacina 674, también denominada Sakacina P, es un péptido antimicrobiano de clase IIa, cuya producción fue detectada en las cepas Lb674 y LTH673 de *Latilactobacillus sakei*. Este compuesto tiene actividad inhibitoria contra cepas de *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, y cepas de bacterias ácido lácticas como *Carnobacterium maltaromaticum*, *Enterococcus faecalis* y *Loigolactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* (Mathiesen et al., 2005; Tessema et al., 2009; Ünlü y Özgen, 2024). La bacteriocina Carnocina CP52 es un péptido antibacteriano de clase IIa reportado en cepas de *Carnobacterium piscicola*, *Lacticaseibacillus casei*,

*Lacticaseibacillus paracasei*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactiplantibacillus plantarum* y *Schleiferilactobacillus harbinensis*. El espectro de inhibición de la Carnocina CP52 comprende a cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*, *Acinetobacter baumannii* y *Enterococcus faecium* (Zhang et al., 2019; Dishan y Gönülalan, 2024; Wonglapsuan et al., 2024; Atanasov et al., 2025; Romyasamit et al., 2025). Con respecto a la Enterocina X, es una bacteriocina perteneciente a la clase IIc compuesta por dos péptidos, detectada en cepas de *Enterococcus faecium*, *Lacticaseibacillus rhamnosus* y *Lacticaseibacillus paracasei*. Dicho compuesto tiene actividad antimicrobiana contra *Listeria innocua*, bacterias esporoformadoras como son *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Heyndrickxia coagulans* y *Nillia circulans*; también es activa contra *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactiplantibacillus plantarum* y *Latilactobacillus sakei* subsp. *sakei* (Hu et al., 2010; Dishan y Gönülalan, 2024; Wonglapsuan et al., 2024; Rahmeh et al., 2025). En la revisión bibliografía no se han encontrado trabajos científicos que hayan evaluado la actividad inhibitoria de las bacteriocinas mencionadas contra especies de *Clostridium*.





El análisis del genoma de la cepa 95 encontró cuatro regiones genómicas posiblemente asociadas a la síntesis de bacteriocinas (figura 2). Los genes codificantes de compuestos antibacterianos que fueron detectados en dichos clusters genéticos, presentaron homología con las bacteriocinas Enterolisina A, Acidocina 8912 y LSEI 2386. La Enterolisina A es un compuesto peptídico termolábil de clase III, detectado originalmente en una cepa de *Enterococcus faecalis*, que inhibe el crecimiento de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, y diversas bacterias ácido lácticas, como son *Enterococcus faecium*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus raffinosus*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Levilactobacillus brevis*, *Latilactobacillus curvatus* y *Latilactobacillus sakei* (Nilsen et al., 2003; Zhang et al., 2013; Fujii et al., 2025). La Acidocina 8912 es una bacteriocina sintetizada por la cepa TK8912 de *Lactobacillus acidophilus*, que pertenece a la clase II. El espectro de inhibición del compuesto comprende a cepas de *Bacillus subtilis*,

*Bacillus licheniformis*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium smegmatis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis* y *Lacticaseibacillus casei* (Tahara et al., 1996; Herranz Sorribes, 2001; Ahmed et al., 2010; Zouhir et al., 2010; Antoshina et al., 2024). La bacteriocina LSEI 2386 fue detectada en cepas de *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei* y *Lacticaseibacillus rhamnosus*. Dicho compuesto peptídico es considerado una bacteriocina termoestable de la subclase IId, capaz de inhibir cepas de *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri*. También se piensa que LSEI 2386 actúa como un péptido señal que coordina procesos biológicos entre bacterias de la misma especie (Kuo et al., 2013; Torres-Miranda et al., 2022; Wonglapsuwan et al., 2024). Cabe comentar que no hay estudios científicos que hayan evaluado la actividad de estas bacteriocinas contra cepas de *Clostridium*.

Debe considerarse que la identificación de genes precursores de bacteriocinas no implica necesariamente que los péptidos antibacterianos correspondientes sean expresados o secretados por las cepas analizadas. No obstante, la presencia de dichos genes evidencia el potencial genético de las cepas 26 y 95 para la síntesis de compuestos con actividad bacteriocinogénica. En el presente estudio se constató experimentalmente la producción de compuestos con actividad anticlostridial y características compatibles con bacteriocinas, lo que respalda la relevancia funcional de los hallazgos genómicos. A futuro, se considera pertinente profundizar en la anotación génica de ambas cepas como parte de su caracterización genotípica, y con el fin de confirmar la identidad y el modo de acción de las bacteriocinas potenciales detectadas mediante análisis bioinformáticos.

#### 4. Conclusión

Mediante la secuenciación del genoma completo, se logró identificar a la cepa 26 como *Lacticaseibacillus zeae* subsp. *silagei*, y a la cepa 95 como *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*. En los genomas ensamblados de dichas cepas se buscaron determinantes genéticos de importancia con el objetivo de determinar el potencial tecnológico de las cepas para su empleo en procesos de producción de alimentos. No se encontraron genes de resistencia a compuestos antimicrobianos ni genes codificantes de factores de virulencia, lo que sugiere que las cepas 26 y 95 serían seguras para el ser humano. Es necesario realizar estudios adicionales para verificar si esto es correcto. Por otra parte, en los cromosomas bacterianos de ambas cepas se encontraron profagos, lo que podría afectar la efectividad de estas cepas como cultivos bioprotectores. En cuanto a la búsqueda de regiones genómicas asociadas a la producción de bacteriocinas hipotéticas, el análisis bioinformático del genoma de la cepa 26 identificó los genes codificantes para la Sakacina 674, Carnocina CP52 y la cadena beta de la Enterocina X. En el caso de la cepa 95, se identificaron genes precursores para Enterolisina A, Acidocina 8912 y LSEI 2386. Las bacteriocinas mencionadas tienen actividad inhibitoria contra diversos microorganismos contaminantes, sin embargo, su potencial como compuestos anticlostridiales no ha sido reportado previamente. A futuro, se considera pertinente purificar las

bacteriocinas producidas por las cepas 26 y 95, para dilucidar su secuencia aminoacídica y determinar si se corresponde con alguna de las bacteriocinas hipotéticas identificadas por análisis bioinformático. Por otro lado, la disponibilidad de los genomas completos de ambas cepas permitirá continuar profundizando en la anotación de genes como parte de su caracterización desde el punto de vista genotípico.

## 5. Bibliografía

Ahmed, Z., Wang, Y., Cheng, Q., & Imran, M. (2010). *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, from production to their application: an overview. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 9, No. 20, 2843 - 2850.

Anisimova, E., Gorokhova, I., Karimullina, G., & Yarullina, D. (2022). Alarming antibiotic resistance of lactobacilli isolated from probiotic preparations and dietary supplements. *Antibiotics*, Vol. 11, No. 11, 1557. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111557>

Antoshina, D.V., Balandin, S.V., Finkina, E.I., Bogdanov, I.V., Eremchuk, S.I., Kononova, D.V., Kovrizhnykh, A.A., & Ovchinnikova, T.V. (2024). Acidocin A and Acidocin 8912 belong to a distinct subfamily of class II bacteriocins with a broad spectrum of antimicrobial activity. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 25, No. 18, 10059. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms251810059>

Arndt, D., Grant, J., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., & Wishart, D. S. (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Research*, Vol. 44, No. W1: W16 - W21. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>

Atanasov, N., Evstatieva, Y., & Nikolova, D. (2025). *In silico* detection of genetic determinants for the acquired antibiotic resistance and biologically active compounds of lactic acid bacteria from the human oral microbiome. *Applied Microbiology*, Vol. 5, No. 3, 60. DOI: <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol5030060>

Biswas, S., & Biswas, I. (2016). Complete genome sequence of *Lactobacillus rhamnosus* strain LRB. *Genome Announcements*, Vol.4, No. 6, e01208-16. DOI: <https://doi.org/10.1128/genomea.01208-16>

Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M.C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R. L., Rebelo, A. R., Florensa, A. R., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J. K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B. B., Malhotra-Kumar, S., Westh, H., Pinholt, M., Anjum, M. F., Duggett, N. A., Kempf, I., Nykäsenoja, S., Olkkola, S., Wiecezorek, K., Amaro, A., Clemente, L., Mossong, J., Losch, S., Ragimbeau, C., Lund, O., & Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 75, No. 12, 3491 - 3500. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, Vol. 10, No. 1. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>

Cantalapiedra, C. P., Hernández-Plaza, A., Letunic, I., Bork, P., & Huerta-Cepas, J. (2021). EggNOG-mapper v2: functional annotation, orthology assignments, and domain prediction at the metagenomics scale. *Molecular Biology and Evolution*, 38: 5825 - 5829. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab293>

Cañaveral Sánchez, I., León Rodríguez, D.A., & Gaviria Arias, D. (2022). Análisis bioinformático de la presencia de bacteriocinas en el genoma de *Lactobacillus plantarum*. Microciencia, Vol. 9, 37 - 56. <https://revistas.unilibre.edu.co/index.php/microciencia/article/view/8591>

Cardinali, F., Rampanti, G., Harasym, J., Lucci, P., Ferrocino, I., Pacetti, D., Fanesi, B., Milanović, V., Garofalo, C., Petruzzelli, A., Savelli, D., Gabucci, C., Aquilanti, L., & Osimani, A. (2025). Comprehensive profiling of smoked cheese from raw goat's milk handcrafted in Lower Silesia (Poland). Food Research International, Vol. 211, 116398. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.116398>

Chen, C.-T., Chao, W.-Y., Lin, C.-H., Shih, T.-W., & Pan, T.-M. (2024). Comprehensive safety assessment of *Lactocaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 through integrated genotypic and phenotypic analysis. Current Issues in Molecular Biology, Vol. 46, 12354 - 12374. DOI: <https://doi.org/10.20944/preprints202409.2271.v1>

Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. Bioinformatics, Vol. 34, No. 17, i884 - i890. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>

Clausen, P. T. L. C., Aarestrup, F. M., & Lund, O. (2018). Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA. BMC Bioinformatics, Vol. 19, No. 1, 307. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2336-6>

Costa, G., Di Piazza, G., Koevoets, P., Iacono, G., Liebana, E., Pasinato, L., Rizzi, V., & Rossi, M. (2022). Guidelines for reporting Whole Genome Sequencing-based typing data through the EFSA One Health WGS System. EFSA Supporting Publications, Vol. 19, No. 6. DOI: <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2022.en-7413>

Dishan, A., & Gönülalan, Z. (2024). *Lactocaseibacillus paracasei* AD22 stress response in brined White cheese matrix: *in vitro* probiotic profiles and molecular characterization. Probiotics and Antimicrobial Proteins, Vol. 17, No. 3, 1725 - 1738. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10216-4>

Feldgarden, M., Brover, V., Haft, D.H., Prasad, A.B., Slotta, D.J., Tolstoy, I., Tyson, G.H., Zhao, S., Hsu, C.-H., McDermott, P.F., Tadesse, D.A., Morales, C., Simmons, M., Tillman, G., Wasilenko, J., Folster, J.P., & Klimke, W. (2019). Validating the AMRFinder tool and resistance gene database by using antimicrobial resistance genotype-phenotype correlations in a collection of isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol. 63, No. 1. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.00483-19>

Fernández, L., Escobedo, S., Guitiérrez, D., Portillo, S., Martínez, B., García, P., & Rodríguez, A. (2017). Bacteriophages in the dairy environment: from enemies to allies. Antibiotics, Vol. 6, No. 27. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics6040027>



Ferrer Florensa, A., Almagro Armenteros, J.J., Clausen, P.T., Nielsen, H., Rost, B., & Aarestrup, F.M. (2025). Whole-genome prediction of bacterial pathogenic capacity on novel bacteria using protein language models, with PathogenFinder2. *BioRxiv*, 2025-04. DOI: <https://doi.org/10.1101/2025.04.12.648497>

Floris, I., Battistini, R., Tramuta, C., Garcia-Vozmediano, A., Musolino, N., Scardino, G., Masotti, C., Brusa, B., Orusa, R., Serracca, L., Razzuoli, E., Martucci, F., & Bianchi, D.M. (2025). Antibiotic resistance in lactic acid bacteria from dairy products in Northern Italy. *Antibiotics*, Vol. 14, No. 4, 375. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics14040375>

Fujii, A., Kawada-Matsuo, M., Le, M.N.-T., Suzuki, Y., Nishihama, S., Shiba, H., Aikawa, T., & Komatsuzawa, H. (2025). Comprehensive analysis of bacteriocins produced by clinical enterococcal isolates and their antibacterial activity against enterococci including VRE. *Scientific Reports*, Vol. 15, No. 1, 4846. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-89518-8>

Galata, V., Fehlmann, T., Backes, C., & Keller, A. (2019). PLSDb: a resource of complete bacterial plasmids. *Nucleic Acids Research*, Vol. 47, No. D1, D195-D202. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gky1050>

Garavaglia, M., Muzlera, A., & Valverde, C. (2023). Comparative genomics and informational content analysis uncovered internal regions of the core genes *rpoD*, *pepN* and *gltX* for an MLSA with genome-level resolving power within the genus *Pseudomonas*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Vol. 179, 107663. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2022.107663>

García-Díez, J., & Saraiva, C. (2021). Use of starter cultures in foods from animal origin to improve their safety. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, Vol. 18, No. 5, 2544. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph18052544>

Grabner F., M., Grabner H., M., Schein, H., Weidenholzer, E., Busche, T., Rückert-Reed, C., & Buchebner-Jance, M. (2023). *Lactocaseibacillus huelsenbergensis* sp. nov., isolated from grass silage and corn silage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 73, No. 10. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006049>

Grujović, M.Ž., Mladenović, K. G., Semedo-Lemsaddek, T., Laranjo, M., Stefanović, O.D., & Kocić-Tanackov, S.D. (2022). Advantages and disadvantages of non-starter lactic acid bacteria from traditional fermented foods: potential use as starters or probiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol. 21, No. 2, 1537 - 1567. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12897>

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29: 1072 - 1075. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>

Herranz Sorribes, C. (2001). Caracterización bioquímica y genética de bacteriocinas producidas por cepas de "*Enterococcus faecium*" de origen cárnico: optimización de la producción molecular de acción de la Enterocina P de "*Enterococcus faecium*" P13. [Tesis de Doctorado, Universidad Complutense de Madrid]. Docta Complutense. <https://hdl.handle.net/20.500.14352/55649>

Hu, C.-B., Malaphan, W., Zendo, T., Nakayama, J., & Sonomoto, K. (2010). Enterocin X, a novel two-peptide bacteriocin from *Enterococcus faecium* KU-B5, has an antibacterial spectrum entirely different from those of its component peptides. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 76, No. 13, 4542 - 4545. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.02264-09>

Huang, C.-H., Li, S.-W., Huang, L., & Watanabe, K. (2018). Identification and classification for the *Lactobacillus casei* group. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 9, 1974. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01974>

Inayah, I., Wibowo, M.S., Julianti, E., & Suciati, T. (2022). Characterization of *Lactobacillus zae* as probiotic and starter culture for tamarillo fermented product. *Food Science and Technology*, Vol. 42, e54021. DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.54021>

Jarocki, P., Komoń-Janczara, E., Młodzińska, A., Sadurski, J., Kołodzińska, K., Łaczmański, Ł., Panek, J., & Frąc, M. (2023). Occurrence and genetic diversity of prophage sequences identified in the genomes of *L. casei* group bacteria. *Scientific Reports*, Vol. 13, No. 1, 8603. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-35823-z>

Jensen, C.S., Iversen, K.H., Dargis, R., Shewmaker, P., Rasmussen, S., Christensen, J.J., & Nielsen, X.C. (2021). *Streptococcus pseudopneumoniae*: use of whole-genome sequences to validate species identification methods. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 59, No. 2, e02503-20. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.02503-20>

Kandasamy, S., Lee, K.-H., Yoo, J., Yun, J., Kang, H.B., Kim, J.E., Oh, M.-H., & Ham, J.-S. (2024). Whole genome sequencing of *Lactocaseibacillus casei* KACC92338 strain with strong antioxidant activity, reveals genes and gene clusters of probiotic and antimicrobial potential. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 15, 1458221. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1458221>

Kim, E., Cho, E.-J., Yang, S.-M., & Kim, H.-Y. (2021a). Identification and monitoring of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies using pangenomic-based novel genetic markers. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 31, No. 2, 280 - 289. DOI: <https://doi.org/10.4014/jmb.2009.09034>

Kim, E., Yang, S.-M., & Kim, H.-Y. (2021b). Differentiation of *Lactocaseibacillus zae* using pan-genome analysis and Real-Time PCR method targeting a unique gene. *Foods*, Vol. 10, No. 9, 2112. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10092112>

Kim, E., Yang, S.-M., Kim, D., & Kim, H.-Y. (2022). Complete genome sequencing and comparative genomics of three potential probiotic strains, *Lactocaseibacillus*

*casei* FBL6, *Lacticaseibacillus chiayiensis* FBL7, and *Lacticaseibacillus zeae* FBL8. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 12, 794315. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.794315>

Kioudi, D.E., Efstathiou, C., Tegopoulos, K., Mantzourani, I., Alexopoulos, A., Plessas, S., Kolovos, P., Koffa, M., & Galanis, A. (2022). Genomic insight into *Lacticaseibacillus paracasei* SP5, reveals genes and gene clusters of probiotic interest and biotechnological potential. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 13, 922689. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.922689>

Kuo, Y.-C., Liu, C.-F., Lin, J.-F., Li, A.-C., Lo, T.-C., & Lin, T.-H. (2013). Characterization of putative class II bacteriocins identified from a non-bacteriocin-producing strain *Lactobacillus casei* ATCC 334. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 97, No. 1, 237 - 246. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4149-2>

Laref, N., & Belkheir, K. (2022). Application of 16S rRNA virtual RFLP for the discrimination of some closely taxonomic-related lactobacilli species. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, Vol. 20, No. 1, 167. DOI: <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00448-8>

Lau, S.K.P., Teng, J.L.L., & Woo, P.C.Y. (2018). Bacterial identification based on universal gene amplification and sequencing (Chapter 1). In Y.-W. Tang, & C.W. Stratton (Eds.), *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology* (3rd. ed., pp. 1 - 29). Springer, Cham. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-95111-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-95111-9_1)

Manni, M., Berkeley, M. R., Seppey, M., Simão, F. A., & Zdobnov, E. M. (2021). BUSCO update: novel and streamlined workflows along with broader and deeper phylogenetic coverage for scoring of eukaryotic, prokaryotic, and viral genomes. *Molecular Biology and Evolution*, Vol. 38, No. 10, 4647 - 4654. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab199>

Mathiesen, G., Huehne, K., Kroeckel, L., Axelsson, L., & Eijsink, V.G.H. (2005). Characterization of a new bacteriocin operon in Sakacin P-producing *Lactobacillus sakei*, showing strong translational coupling between the bacteriocin and immunity genes. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 71, No. 7, 3565 - 3574. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.71.7.3565-3574.2005>

McArthur, A.G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M.A., Baylay, A.J., Bhullar, K., Canova, M.J., De Pascale, G., Ejim, L., Kalan, L., King, A.M., Koteva, K., Morar, M., Mulvey, M.R., O'Brien, J.S., Pawlowski, A.C., Piddock, L.J.V., Spanogiannopoulos, P., Sutherland, A.D., Tang, I., Taylor, P.L., Thaker, M., Wang, W., Yan, M., Yu, T., & Wright, G.D. (2013). The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 57, No. 7, 3348 - 3357. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.00419-13>

Nilsen, T., Nes, I.F., & Holo, H. (2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No. 5, 2975 - 2984. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.69.5.2975-2984.2003>

Olivera Rodi, J. (2018). Selección de bacterias ácido lácticas (LAB) y adjuntas (NSLAB) autóctonas de leche y queso, para el control de *Clostridium* spp. responsables del defecto de “hinchazón tardía”. [Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, Universidad de la República]. Repositorio Colibrí. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/21466>

Prjibelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A., & Korobeynikov, A. (2020). Using SPAdes *de novo* assembler. Current Protocols in Bioinformatics, Vol. 70, No. 1, e102. DOI: <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>

Queiroz, L.L., Hoffmann, C., Lacorte, G.A., de Melo Franco, B.D.G., & Todorov, S.D. (2022). Genomic and functional characterization of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from Boza, a traditional cereal-based beverage. Scientific Reports, Vol. 12, 1460. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05086-1>

Quigley, L., O’Sullivan, O., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., & Cotter, P.D. (2012). A comparison of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese. Journal of Applied Microbiology, Vol. 113, No. 1, 96 - 105. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05294.x>

Racioppo, A., Guerrieri, A., Corbo, M.R., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A., & Speranza, B. (2025). Sub-lethal injury in foodborne microorganisms: an experimental comparison between ultrasound and traditional inactivation techniques. Applied Food Research, Vol. 5, No. 2, 101119. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.afres.2025.101119>

Rahmeh, R., Akbar, A., Kishk, M., Almomin, S., Al-Ateeqi, A., & Shajan, A. (2025). Antibacterial activity of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* R9 and the effect of bacteriocins on the microbial population of raw camel milk. International Dairy Journal, Vol. 171, 106399. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2025.106399>

Rodrigues, M.X. (2016). Molecular characterization of bacterial isolates and microbiome: study of mastitic milk, bulk tank milk, and cheese processing plants. [PhD dissertation, Universidade de São Paulo]. Agência USP de Gestão da Informação Acadêmica (AGUIA). <https://teses.usp.br/handle/11449/146396>

Romyasamit, C., Surachat, K., Pattarangoon, N.C., Suksabay, P., Permpoon, U., Nam, T.-G., & Sornsene, P. (2025). Phenotypic and genomic insights into *Schleiferilactobacillus harbinensis* WU01, a candidate probiotic with broad-spectrum antimicrobial activity against ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter*) Pathogens. Foods, Vol. 14, No. 7, 1161. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods14071161>

Rossi, F. (2023). Special Issue “Functional characterization of lactic acid bacteria”: editorial. Microorganisms, Vol. 11, No. 5, 1190. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051190>

Sabat, A.J., van Zanten, E., Akkerboom, V., Wisselink, G., van Slochteren, K., de Boer, R.F., Hendrix, R., Friedrich, A.W., Rossen, J.W.A., & Kooistra-Smid, A.M. D. (2017). Targeted next-generation sequencing of the 16S-23S rRNA region for culture-independent bacterial identification - increased discrimination of closely related species. *Scientific Reports*, Vol. 7, No. 1. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03458-6>

Schwengers, O., Jelonek, L., Dieckmann, M.A., Beyvers, S., Blom, J., & Goesmann, A. (2021). Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. *Microbial Genomics*, Vol. 7, No. 11, 000685. DOI: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000685>

Shao, L., Sun, Y., Zou, B., Zhao, Y., Li, X., & Dai, R. (2023). Sublethally injured microorganisms in food processing and preservation: quantification, formation, detection, resuscitation and adaption. *Food Research International*, Vol. 165, 112536. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112536>

Sitdhipol, J., Niwasabutra, K., Chaiyawan, N., Nuankham, K., Thanagornyothin, T., Tanasupawat, S., Chanput, W.P., Phapugrangkul, P., Chaipanya, C., Phuengjayaem, S., Poothong, S., & Kingkaew, E. (2025). Evaluating the safety and efficacy of *Lacticaseibacillus paracasei* TISTR 2593 as a therapeutic probiotic for obesity prevention. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 16, 1501395. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1501395>

Souza, L.V., Martins, E., Moreira, I.M.F.B., & de Carvalho, A.F. (2022). Strategies for the development of bioprotective cultures in food preservation. *International Journal of Microbiology*, Vol. 2022, 6264170. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/6264170>

Stoppani, N., Colussi, S., Pastorino, P., Prearo, M., Sciuto, S., Altinok, I., Öztürk, R.Ç., Ture, M., Vela, A.I., del Mar Blanco, M., Kotzamanidis, C., Bitchava, K., Malousi, A., Fariano, L., Volpatti, D., Acutis, P.L., & Fernández-Garayzábal, J.F. (2023). 16S-23S rRNA Internal Transcribed Spacer region (ITS) sequencing: a potential molecular diagnostic tool for differentiating *Lactococcus garvieae* and *Lactococcus petauri*. *Microorganisms*, Vol. 11, No. 5, 1320. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051320>

Tahara, T., Oshimura, M., & Kanatani, K. (2008). Mode of action of Acidocin 8912, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* TK8912. *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 23, No. 3, 192 - 194. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.1996.tb00062.x>

Tessema, G.T., Møretrø, T., Kohler, A., Axelsson, L., & Naterstad, K. (2009). Complex phenotypic and genotypic responses of *Listeria monocytogenes* strains exposed to the class IIa bacteriocin Sakacin P. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 75, No. 22, 6973–6980. <https://doi.org/10.1128/aem.00608-09>

Torres-Miranda, A., Melis-Arcos, F., & Garrido, D. (2022). Characterization and identification of probiotic features in *Lacticaseibacillus paracasei* using a



comparative genomic analysis approach. Probiotics and Antimicrobial Proteins, Vol. 14, No. 6, 1211 - 1224. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09999-1>

Ünlü, N., & Özgen, A. (2024). Investigation of Polyvinyl Alcohol (PVA)-Sakacin P interaction by molecular docking method. İstanbul Gelişim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, Vol. 22, 73 - 80. DOI: <https://doi.org/10.38079/igusabder.1224944>

van Heel, A.J., de Jong, A., Song, C., Viel, J.H., Kok, J., & Kuipers, O.P. (2018). BAGEL 4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. Nucleic Acids Research, Vol. 46, No. W1, W278 - W281. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gky383>

Výrostková, J., Regecová, I., Kováčová, M., Marcinčák, S., Dudriková, E., & Mal'ová, J. (2020). Antimicrobial resistance of *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus zeae* in raw milk. processes, Vol. 8, No. 12, 1627. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr8121627>

Wishart, D. S., Han, S., Saha, S., Oler, E., Peters, H., Grant, J., Stothard, P., & Gautam, V. (2023). PHASTEST: Faster than PHASTER, Better than PHAST, Nucleic Acids Research (Web Server Issue). DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkad382>

Wittouck, S. (2021). Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. [PhD dissertation, University of Antwerp - Katholieke Universiteit Leuven]. Lirias. <https://hdl.handle.net/20.500.12942/6609>

Wonglapsuwan, M., Pahumunto, N., Teanpaisan, R., & Surachat, K. (2024). Unlocking the genetic potential of *Lactocaseibacillus rhamnosus* strains: medical applications of a promising probiotic for human and animal health. Heliyon, Vol. 10, No. 8, e29499. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e29499>

You, L., Lv, R., Jin, H., Ma, T., Zhao, Z., Kwok, L.-Y., & Sun, Z. (2023). A large-scale comparative genomics study reveals niche-driven and within-sample intra-species functional diversification in *Lactocaseibacillus rhamnosus*. Food Research International, Vol. 173, 113446. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113446>

Zhang, D., Zou, Y., Shi, Y., Zhang, J., Liu, J., Wu, G., Zhang, J., Gao, Y., Chen, M., & Li, Y.-X. (2025). Systematically investigating and identifying bacteriocins in the human gut microbiome. Cell Genomics, Vol. 5, 100983. DOI: <https://doi.org/10.1101/2024.07.15.603639>

Zhang, P., Gänzle, M., & Yang, X. (2019). Complementary antibacterial effects of bacteriocins and organic acids as revealed by comparative analysis of *Carnobacterium* spp. from meat. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 85, No. 20, e01227-19. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.01227-19>

Zhang, T., Pan, Y., Li, B., Ou, J., Zhang, J., Chen, Y., Peng, X., & Chen, L. (2013). Molecular cloning and antimicrobial activity of Enterolysin A and Helveticin J of

bacteriolysins from metagenome of Chinese traditional fermented foods. Food Control, Vol. 31, No. 2, 499 - 507. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.015>

Zhao, L., Zhang, Y., Liu, Y., Zhong, J., & Zhang, D. (2023). Assessing the safety and probiotic characteristics of *Lactocaseibacillus rhamnosus* X253 via complete genome and phenotype analysis. Microorganisms, Vol. 11, No.1, 140. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010140>

Zhou, Y., Liang, Y., Lynch, K.H., Dennis, J.J., & Wishart, D.S. (2011). PHAST: a fast phage search tool. Nucleic Acids Research, Vol. 39, (suppl.), W347 - W352. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkr485>

Zouhir, A., Hammami, R., Fliss, I., & Hamida, J.B. (2010). A new structure-based classification of Gram-positive bacteriocins. The Protein Journal, Vol. 29, No. 6, 432 - 439. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10930-010-9270-4>



## Conclusión general

Las cepas 26 y 95 de *Lactocaseibacillus* fueron previamente aisladas de la línea de producción de quesos artesanales y seleccionadas por su potencial inhibitorio frente a especies de *Clostridium* causantes del defecto de hinchazón tardía. En el marco de esta tesis doctoral, se dio continuidad a esta línea de investigación con el objetivo de evaluar la efectividad de la actividad anticlostridial de las cepas 26 y 95 en quesos, así como su capacidad para prevenir la aparición de dicha alteración. Existen dos estrategias para incorporar los compuestos antimicrobianos en los alimentos, la modalidad *in situ* que consiste en adicionar las cepas productoras de estos compuestos durante el proceso de elaboración, para que los sintetizen en la matriz del alimento, y la estrategia *ex situ* en la cual los metabolitos antimicrobianos son purificados a partir de cultivos preparados con las cepas productoras en forma *in vitro* y posteriormente agregados en el producto.

Teniendo en cuenta esta última estrategia, en el capítulo I se evaluaron distintas condiciones de crecimiento para obtener extractos concentrados con la mayor actividad anticlostridial. Los estudios realizados indicaron que los compuestos anticlostridiales sintetizados por las cepas 26 y 95 tienen efecto bactericida, y que diferentes cepas de *C. tyrobutyricum* procedentes de quesos con hinchazón tardía, difirieron en su sensibilidad frente a los mismos. Al evaluar la estabilidad de los extractos concentrados de ambas cepas, se observó que su actividad inhibitoria no se ve modificada en el rango de pH de 4.0 a 7.0, por lo que serían compatibles con la acidez desarrollada en el proceso de elaboración de quesos semiduros y duros. Además, los extractos concentrados de ambas cepas podrían ser almacenados a -18 y -24 °C con pérdidas mínimas en su actividad anticlostridial.

La estrategia de producción *in situ* de los compuestos antimicrobianos, requiere evaluar previamente la compatibilidad de las cepas biopreservantes con el proceso de elaboración quesera, principalmente su interacción con los cultivos iniciadores empleados. En los análisis discutidos en el capítulo II se determinó que las cepas 26 y 95 no afectaron la velocidad de crecimiento (constante K) de cepas comerciales de *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* y *Lactobacillus helveticus*. Tampoco se observó cambios en la tasa de acidificación causada por estas cepas en presencia de las cepas anticlostridiales. En consecuencia, no se esperaría que interfirieran en la acción de los cultivos iniciadores comerciales utilizados para la elaboración de quesos. De acuerdo a los datos obtenidos, las cepas 26 y 95 mantienen su viabilidad a las concentraciones de sal de las salmueras empleadas en la producción quesera. Esto es importante porque dichas cepas son NSLAB, lo que implica que su proliferación en el queso, y el efecto biopreservante que ejercen, ocurren en la etapa de maduración, por lo que es necesario que conserven su viabilidad luego del proceso de salado. Las cepas 26 y 95 no producen cantidades detectables de CO<sub>2</sub> al fermentar carbohidratos como lactosa, glucosa, galactosa, xilosa ni arabinosa. Debido a lo anterior, el empleo de estas cepas como cultivos adjuntos de quesería no debería producir ojos no deseados en la masa del queso.

Visto que los estudios realizados sugieren que las cepas 26 y 95 podrían ser utilizadas en la elaboración de quesos sin afectar el proceso, en el capítulo III se evaluó la efectividad de la actividad anticlostridial y prevención de la aparición del defecto de hinchazón tardía, al emplear las cepas 26 y 95 como cultivos adjuntos en la elaboración de queso tipo Dambo a escala de laboratorio. Varios factores pueden incidir en la ocurrencia del defecto de hinchazón tardía como son la concentración de esporas clostridiales presentes en la leche, las cepas de *Clostridium* contaminantes, la composición general de la microflora láctea, y los parámetros fisicoquímicos del proceso de producción quesera. Estos factores influyen en la efectividad de la prevención de la hinchazón tardía por las cepas biopreservantes. Teniendo en cuenta lo anterior, y los resultados obtenidos, se puede concluir que ambas cepas podrían ser candidatas a ser utilizadas como cultivos iniciadores adjuntos para inhibir el crecimiento de *Clostridium* en quesos, previniendo la aparición de hinchazón tardía, sin afectar las características fisicoquímicas y de calidad sensorial esperadas para un queso tipo Dambo.

Para poder emplear cepas microbianas como cultivos iniciadores en la producción de alimentos, existen ciertos requisitos que deben ser cumplidos, como son la identificación de las cepas a nivel de especie y/o subespecie, la ausencia de genes de resistencia a compuestos antimicrobianos y genes codificantes de factores de virulencia. Estos requisitos brindan información sobre la inocuidad de dichas cepas. Dichos análisis fueron abordados en el capítulo IV. A través de la secuenciación del genoma completo, la cepa 26 fue identificada como *Lacticaseibacillus zae* subsp. *silagei*, y la cepa 95 como *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Los estudios realizados no mostraron presencia de genes de resistencia a antimicrobianos, ni genes que codifiquen factores de virulencia, por lo que las cepas 26 y 95 serían seguras para el ser humano. Sin embargo, la presencia de profagos en el genoma de ambas cepas podría comprometer su efectividad como cultivos bioprotectores desde el punto de vista tecnológico. En referencia a la actividad anticlostridial de las cepas 26 y 95, hay evidencia que indica que ésta podría deberse a la producción de bacteriocinas. En los genomas de dichas cepas detectaron regiones asociadas a la síntesis de bacteriocinas hipotéticas. El análisis bioinformático de *L. zae* subsp. *silagei* 26, identificó genes codificantes para la Sakacina 674, Carnocina CP52 y la cadena beta de la Enterocina X. En el caso de *L. paracasei* subsp. *paracasei* 95 se detectaron genes precursores para Enterolisina A, Acidocina 8912 y LSEI 2386. Las bacteriocinas mencionadas tienen actividad inhibitoria contra diversos microorganismos contaminantes, si bien su acción como compuestos anticlostridiales no ha sido descrito previamente. La disponibilidad de los genomas completos de ambas cepas permitirá profundizar en la anotación de genes como parte de su caracterización desde el punto de vista genotípico.

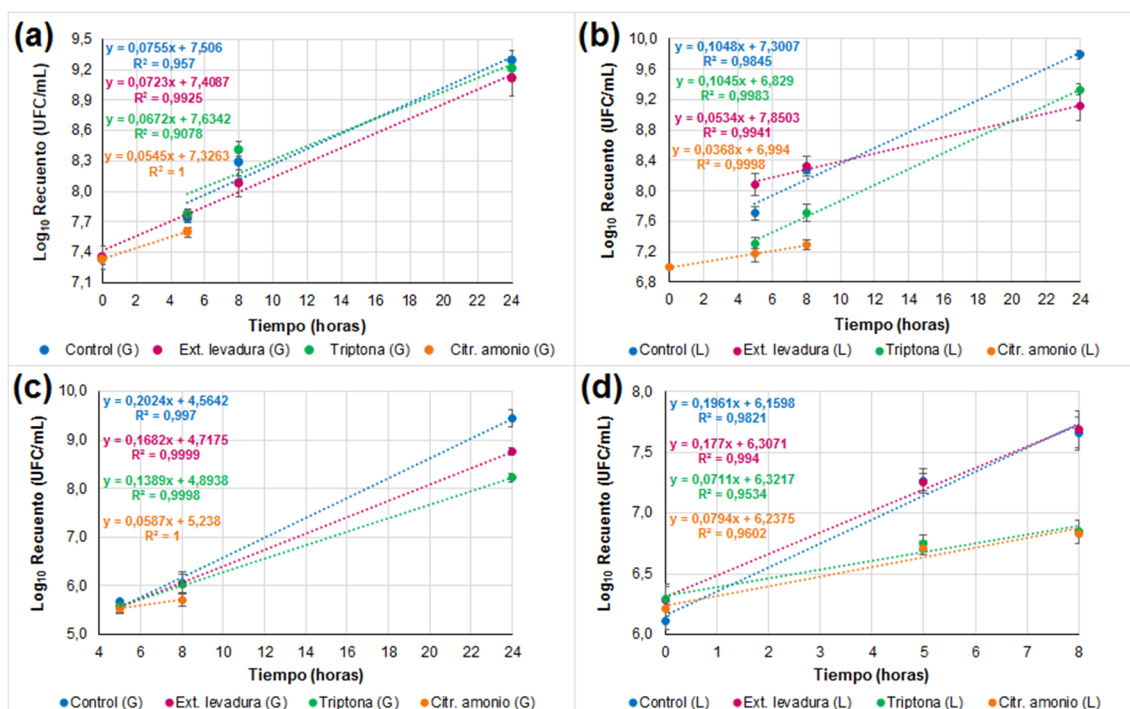
En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis demuestran la factibilidad de utilizar las cepas 26 y 95 de *Lacticaseibacillus* como cultivos bioprotectores en la elaboración de quesos, ya que ambas mostraron actividad anticlostridial efectiva frente a cepas de *Clostridium* asociadas con la hinchazón tardía, sin interferir con los cultivos iniciadores comerciales, ni afectar las propiedades tecnológicas, fisicoquímicas o sensoriales del producto final. Además, su estabilidad bajo las condiciones del proceso quesero y de almacenamiento, junto con la ausencia de genes de resistencia o virulencia, refuerzan su potencial aplicación segura y

tecnológica. En consecuencia, las cepas 26 y 95 representan candidatas prometedoras para el desarrollo de estrategias naturales de biopreservación, contribuyendo a mejorar la calidad de los quesos y a reducir la incidencia del defecto de hinchazón tardía en la industria quesera.

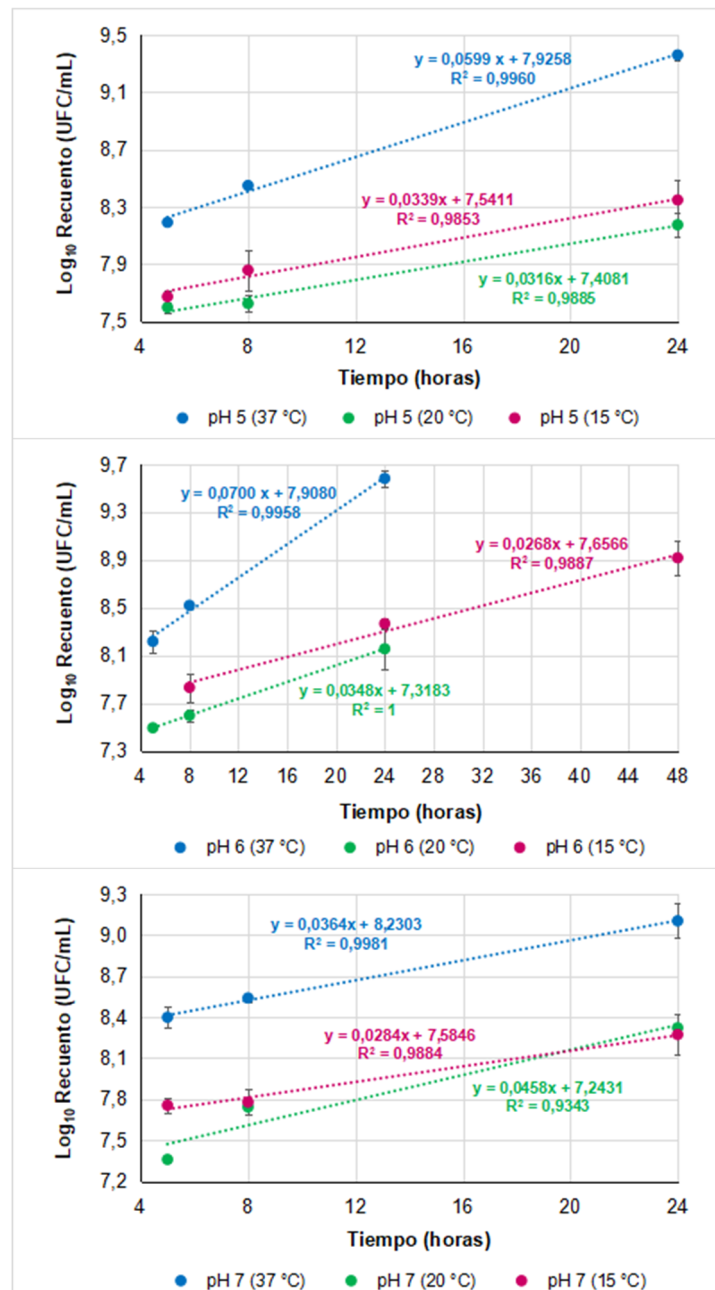
# Anexos

## Anexo I

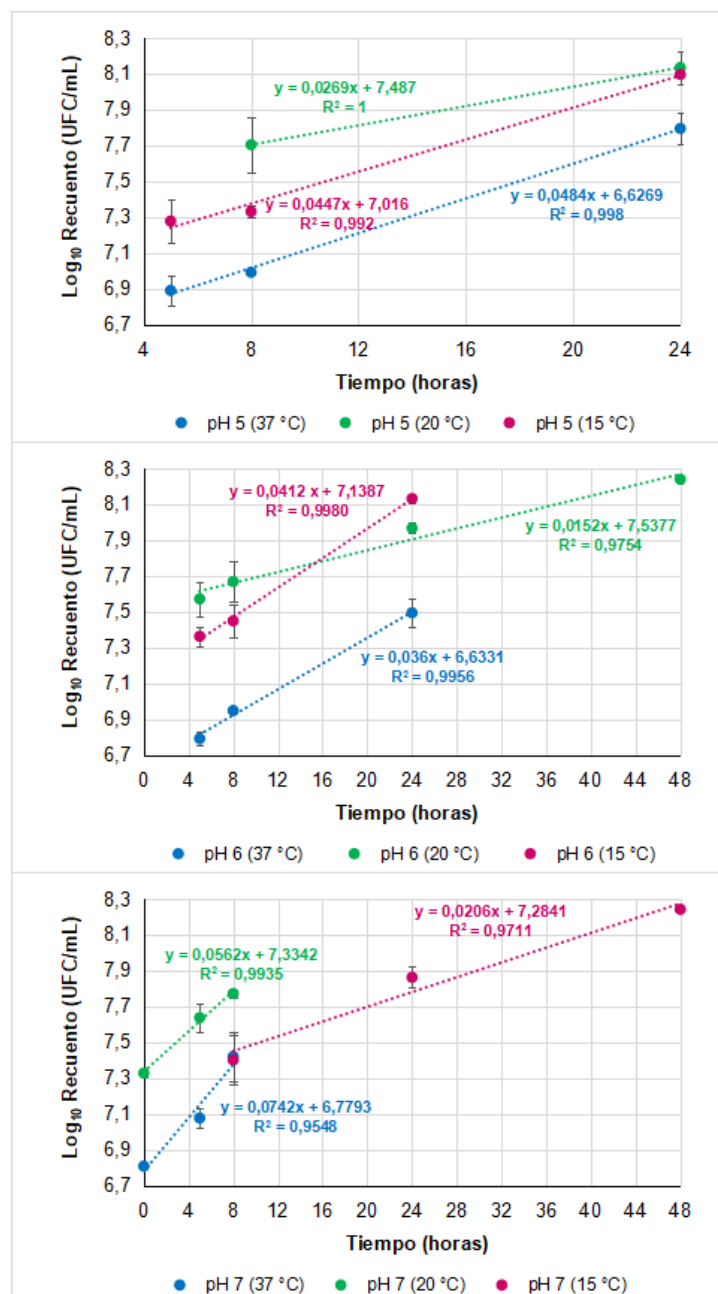
### 1. Ajuste de las condiciones de cultivo para incrementar la producción de compuestos anticiostridiales en extractos concentrados



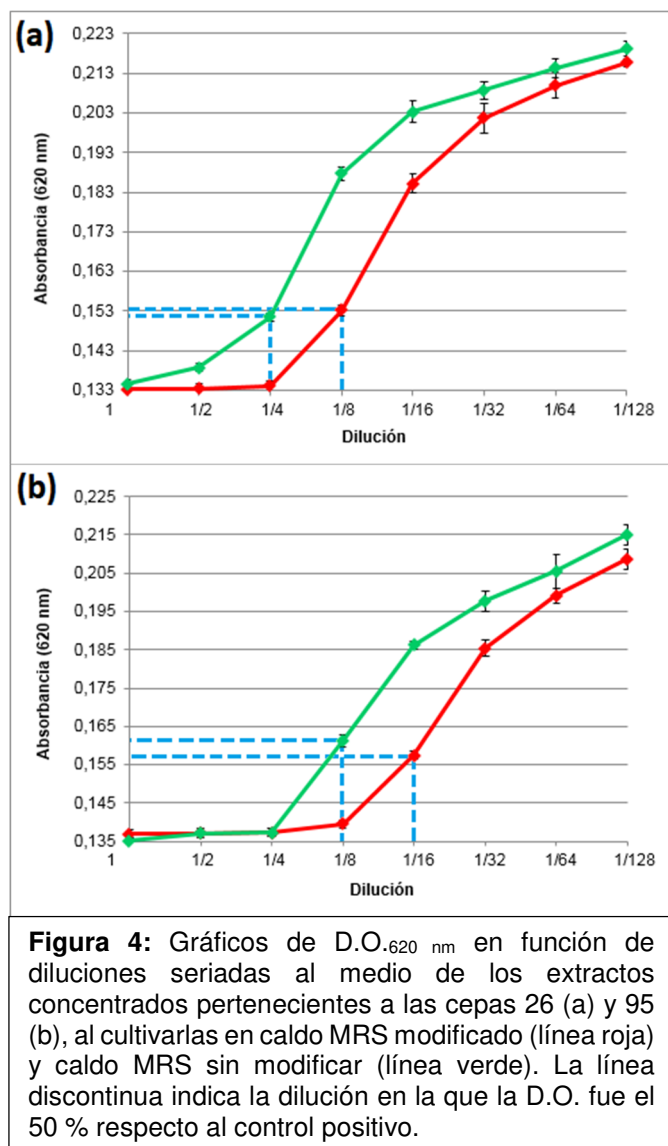
**Figura 1:** Gráficas de linealización realizadas a partir de los datos de recuento bacteriano (UFC/mL) correspondientes a la fase de crecimiento exponencial de las cepas 26 (a, b) y 95 (c, d) al cultivarlas en presencia de glucosa (G) o lactosa (L) combinadas con las fuentes de nitrógeno: extracto de levadura, triptona, citrato de amonio, y sin adición de fuente de nitrógeno (control).



**Figura 2:** Gráficas de linealización realizadas a partir de los datos de recuento bacteriano (UFC/mL) correspondientes a la fase de crecimiento exponencial de la cepa 26, al cultivarla a pH 5, 6 y 7 a las temperaturas 15, 20 y 37 °C.

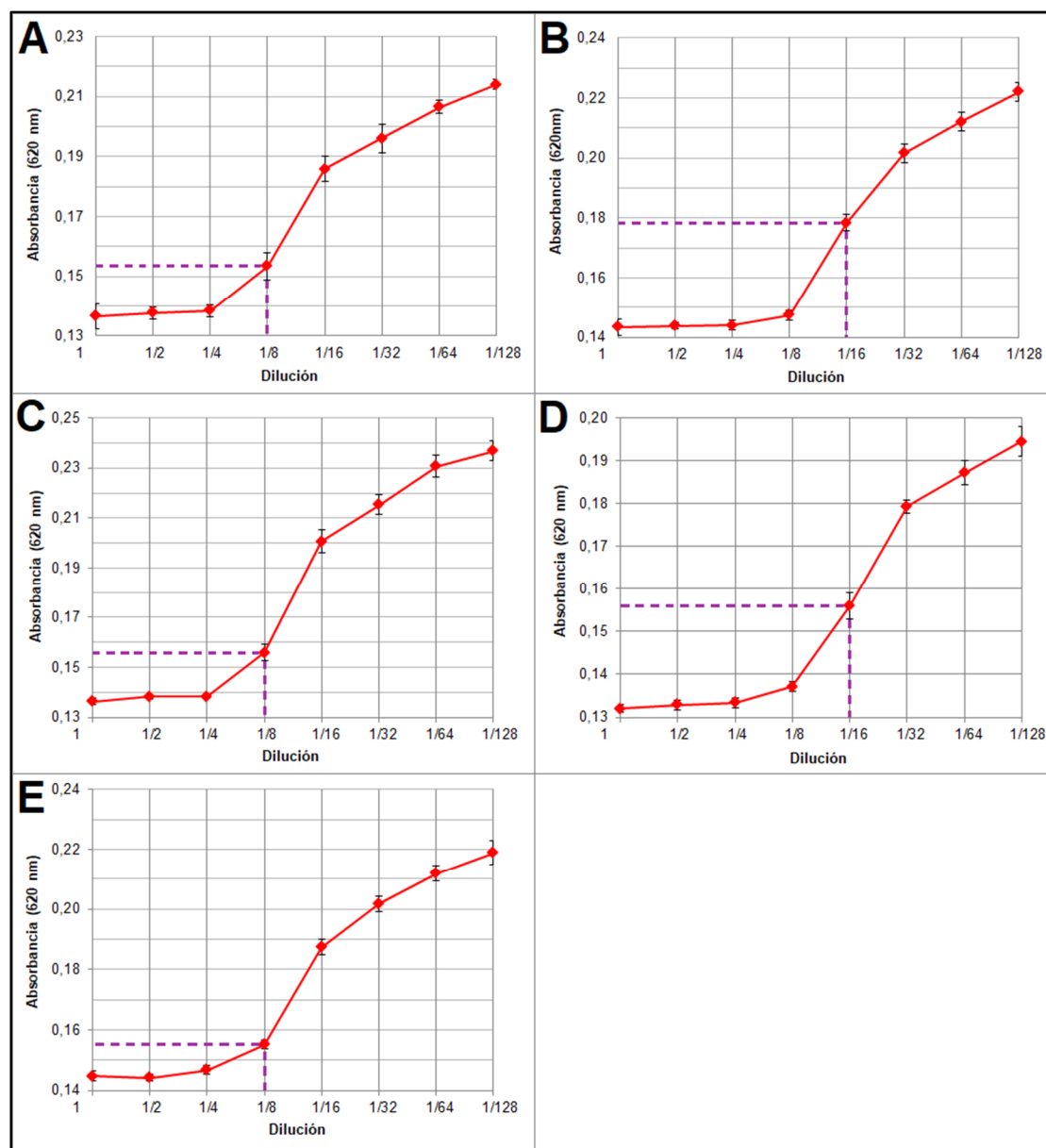


**Figura 3:** Gráficas de linealización realizadas a partir de los datos de recuento bacteriano (UFC/mL) correspondientes a la fase de crecimiento exponencial de la cepa 95, al cultivarla a pH 5, 6 y 7 a las temperaturas 15, 20 y 37 °C.

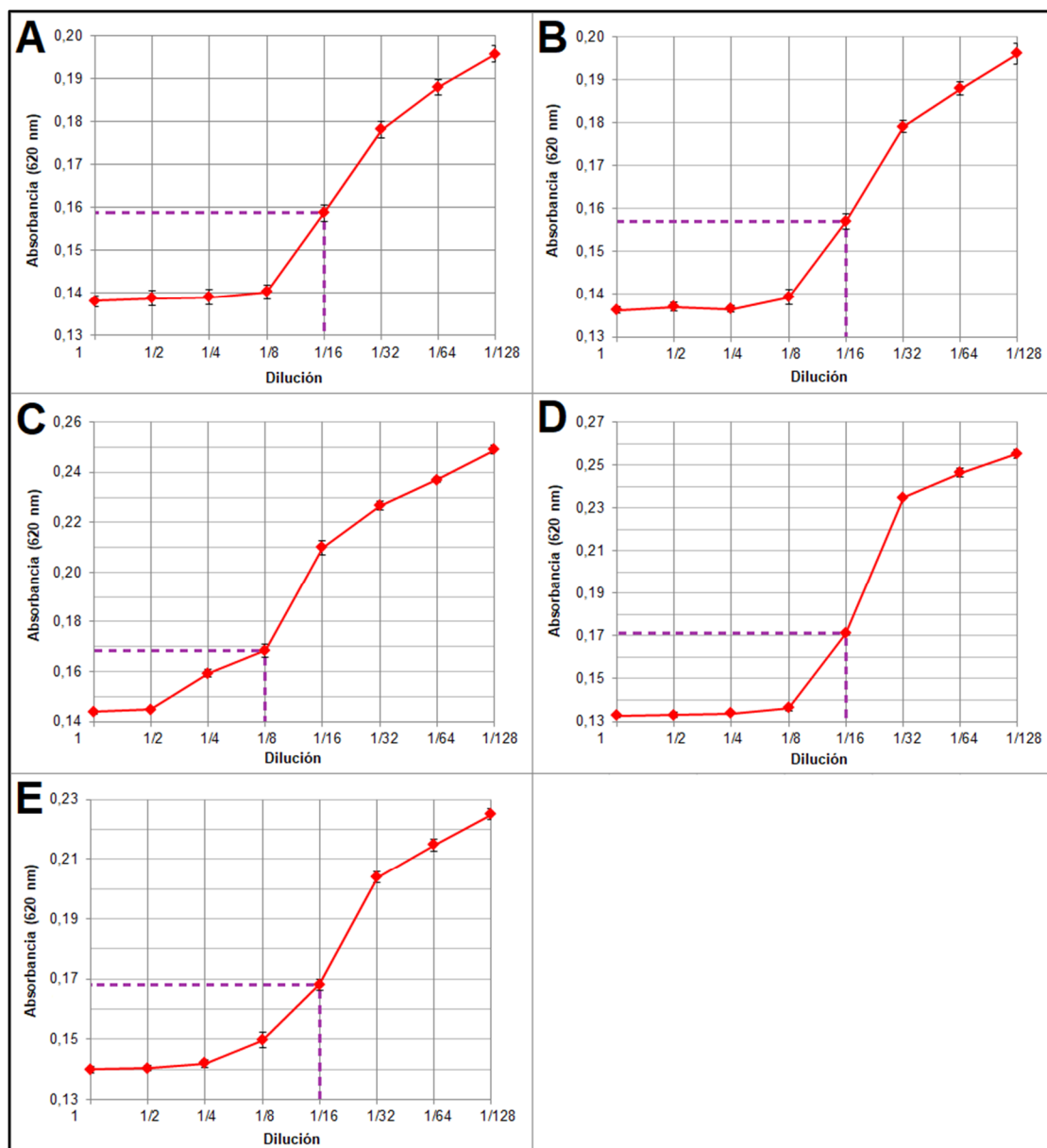




## 2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de extractos concentrados de las cepas 26 y 95 de *Lacticaseibacillus*

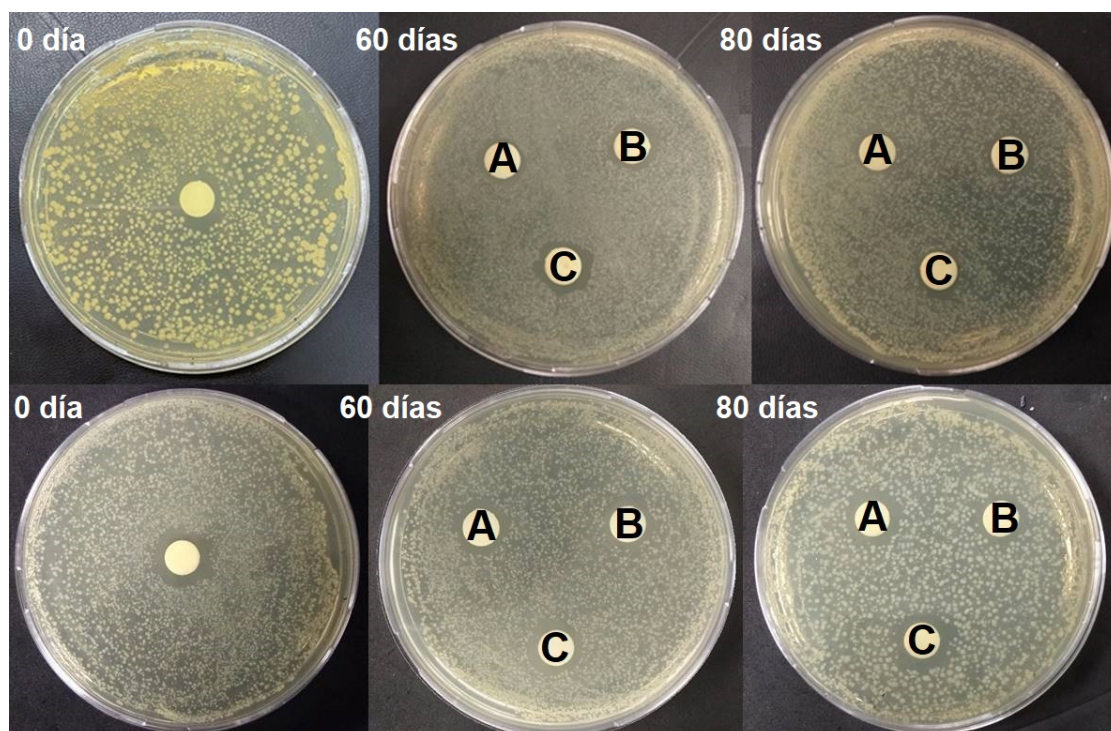


**Figura 5:** Gráficas de D.O.<sub>620 nm</sub> en función de diluciones del extracto concentrado de *Lacticaseibacillus* 26 correspondientes a las cepas de *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 (A), 175.1 (B), 193.5 (C), 206.2 (D) y 206.6 (E). La línea discontinua indica la dilución en la que la D.O. fue el 50 % respecto al control positivo.



**Figura 6:** Gráficas de D.O.<sub>620 nm</sub> en función de diluciones del extracto concentrado de *Lactacaseibacillus* 95 correspondientes a las cepas de *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 (A), 175.1 (B), 193.5 (C), 206.2 (D) y 206.6 (E). La línea discontinua indica la dilución en la que la D.O. fue el 50 % respecto al control positivo.

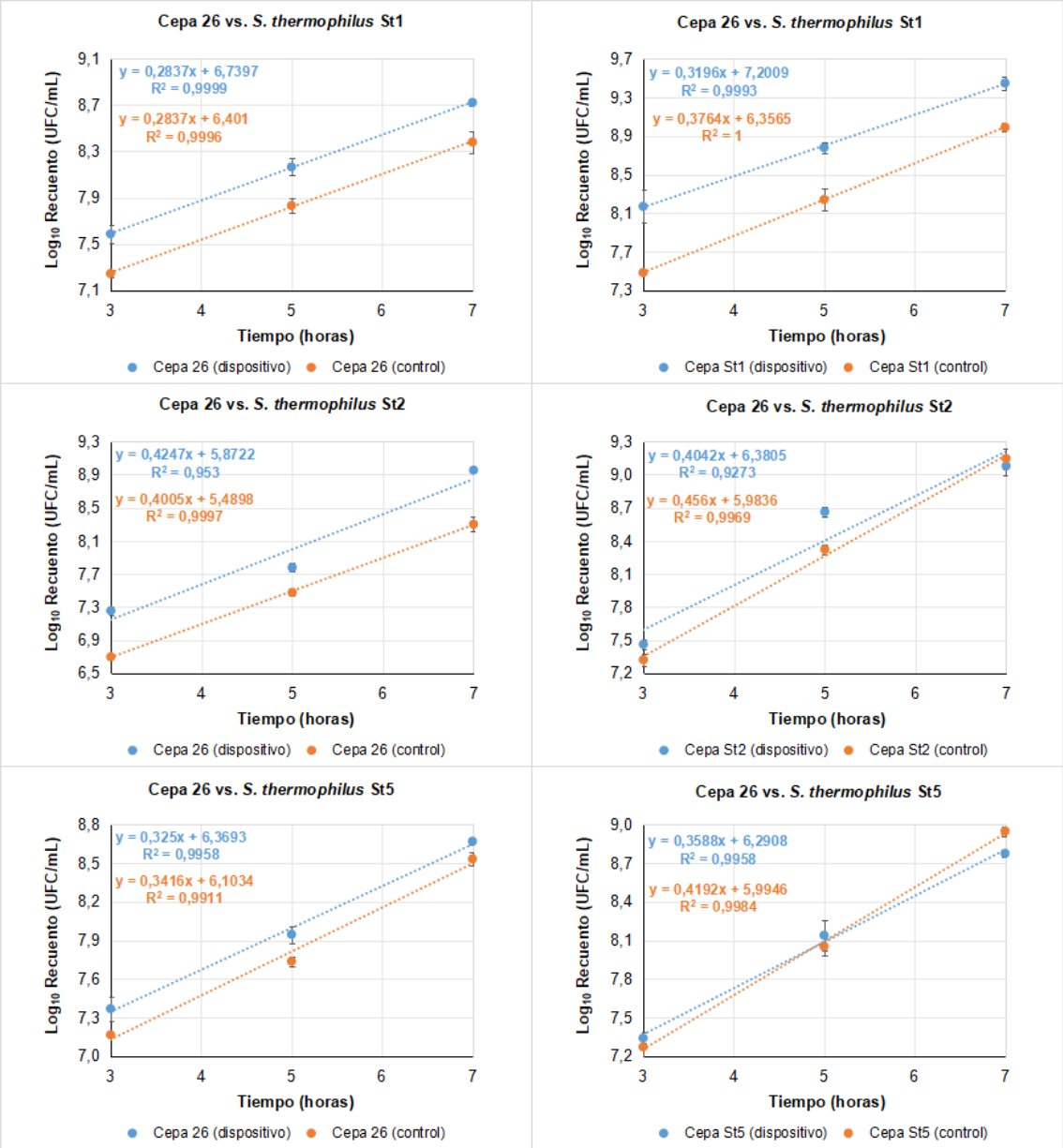
### 3. Efecto del pH y la temperatura de refrigeración en la estabilidad de extractos concentrados



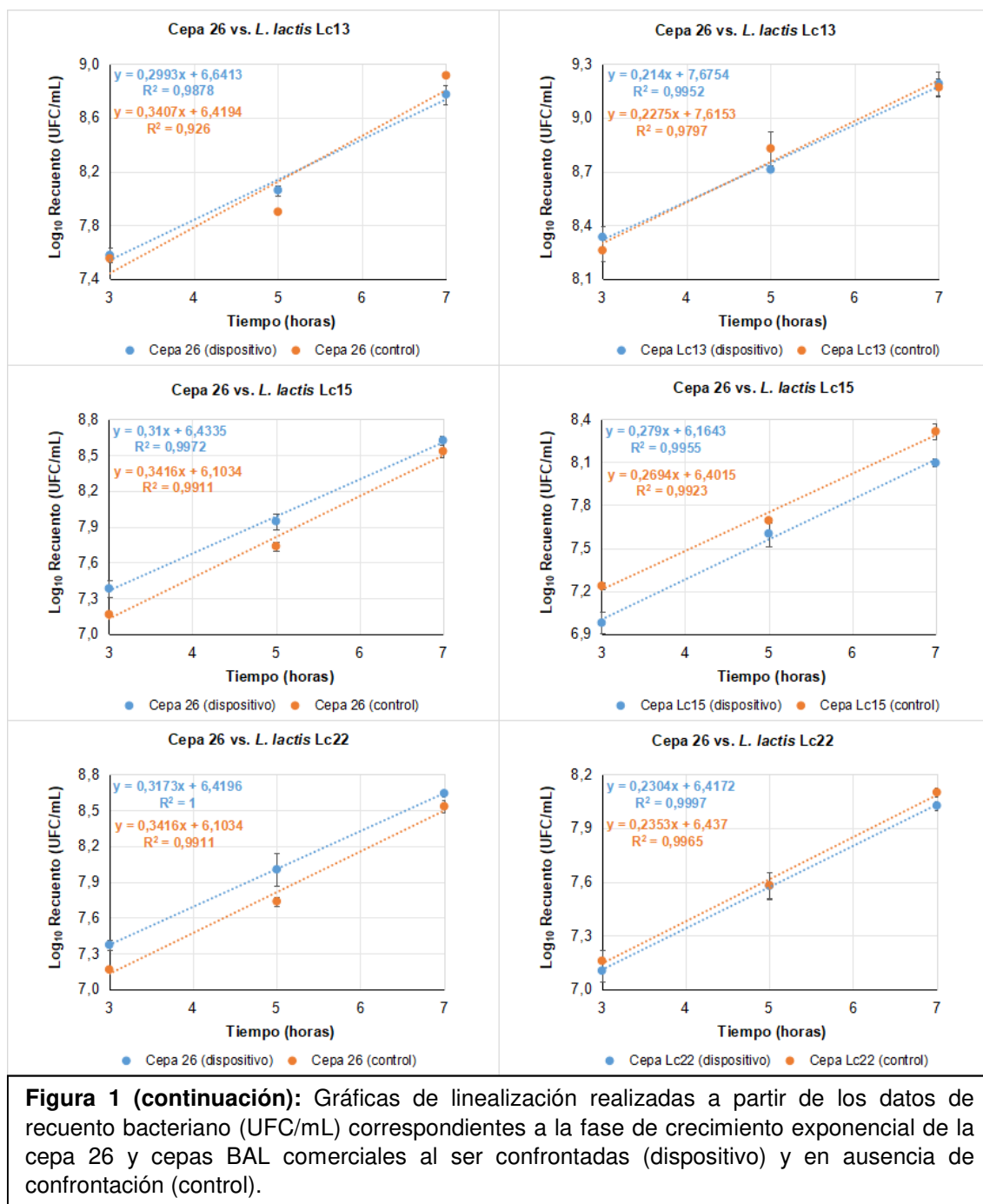
**Figura 7:** Actividad anticlostridial producida por extractos concentrados de las cepas 26 (fila superior) y 95 (fila inferior) contra *C. tyrobutyricum* ATCC 25755, a los 0 (control), 60 y 80 días de refrigeración a 4 °C (A), -18 °C (B) y -24 °C (C).

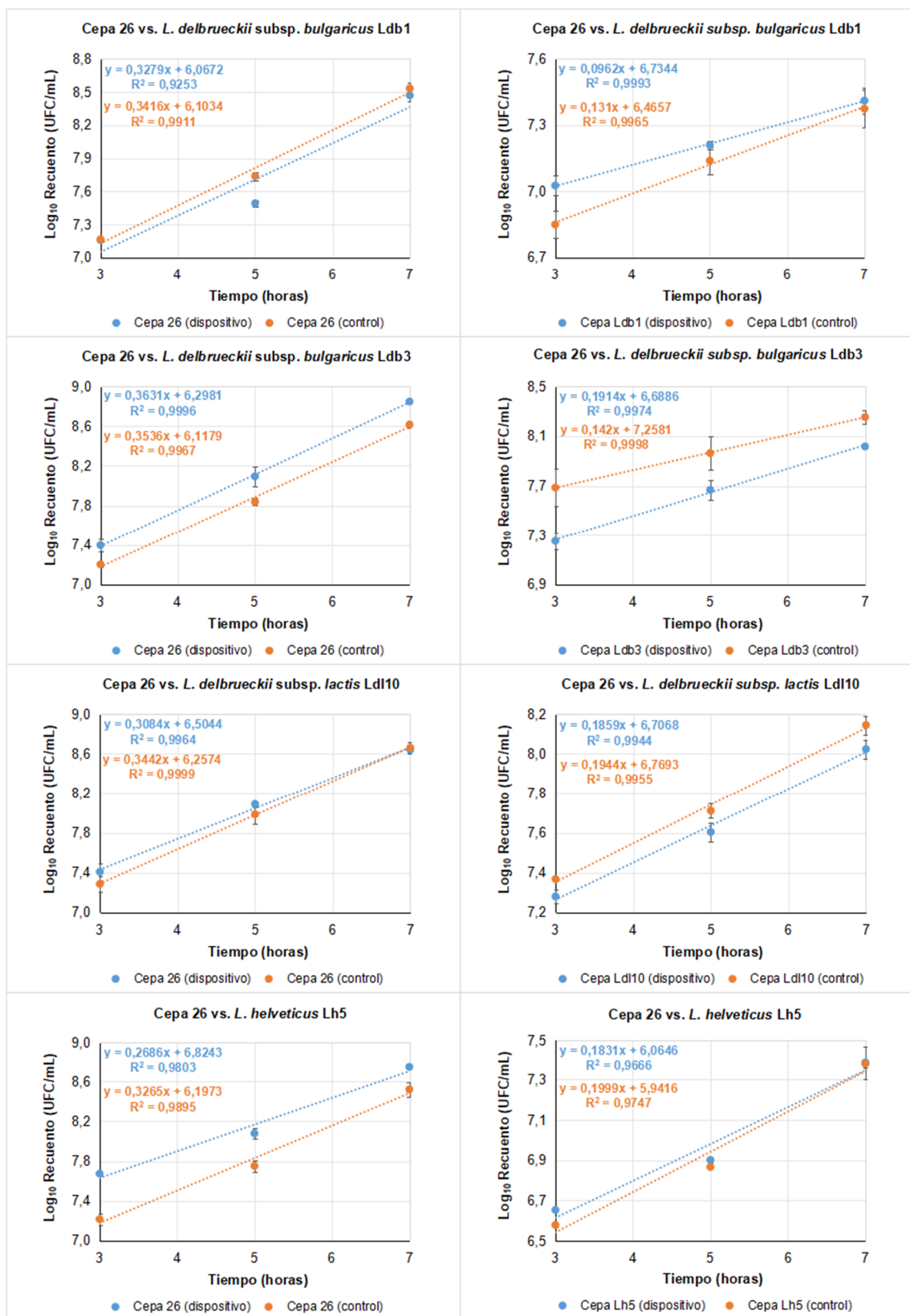
Anexo II

1. Compatibilidad de cepas BAL antiostridiales con cepas BAL empleadas en fermentos

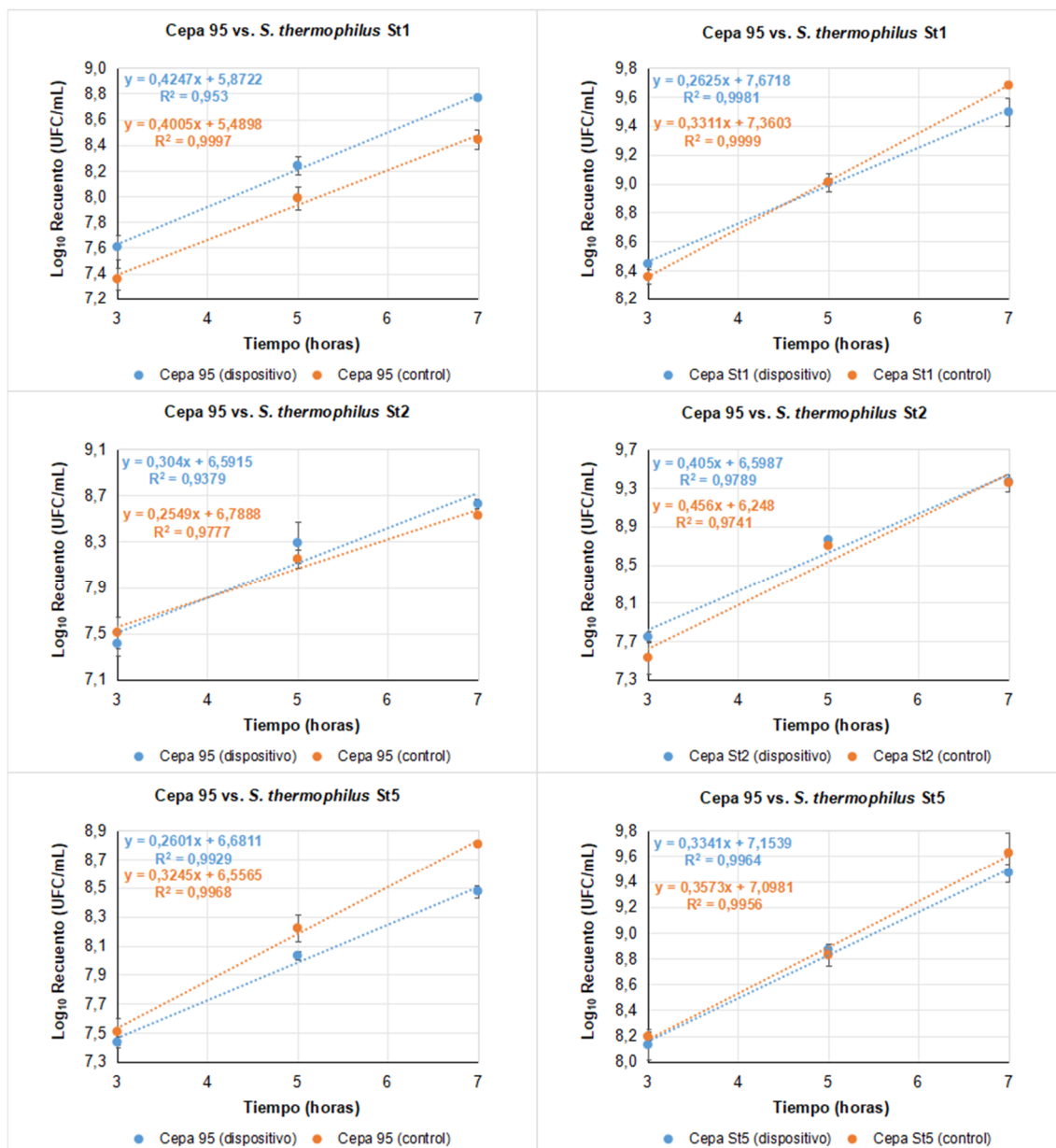


**Figura 1:** Gráficas de linealización realizadas a partir de los datos de recuento bacteriano (UFC/mL) correspondientes a la fase de crecimiento exponencial de la cepa 26 y cepas BAL comerciales al ser confrontadas (dispositivo) y en ausencia de confrontación (control).



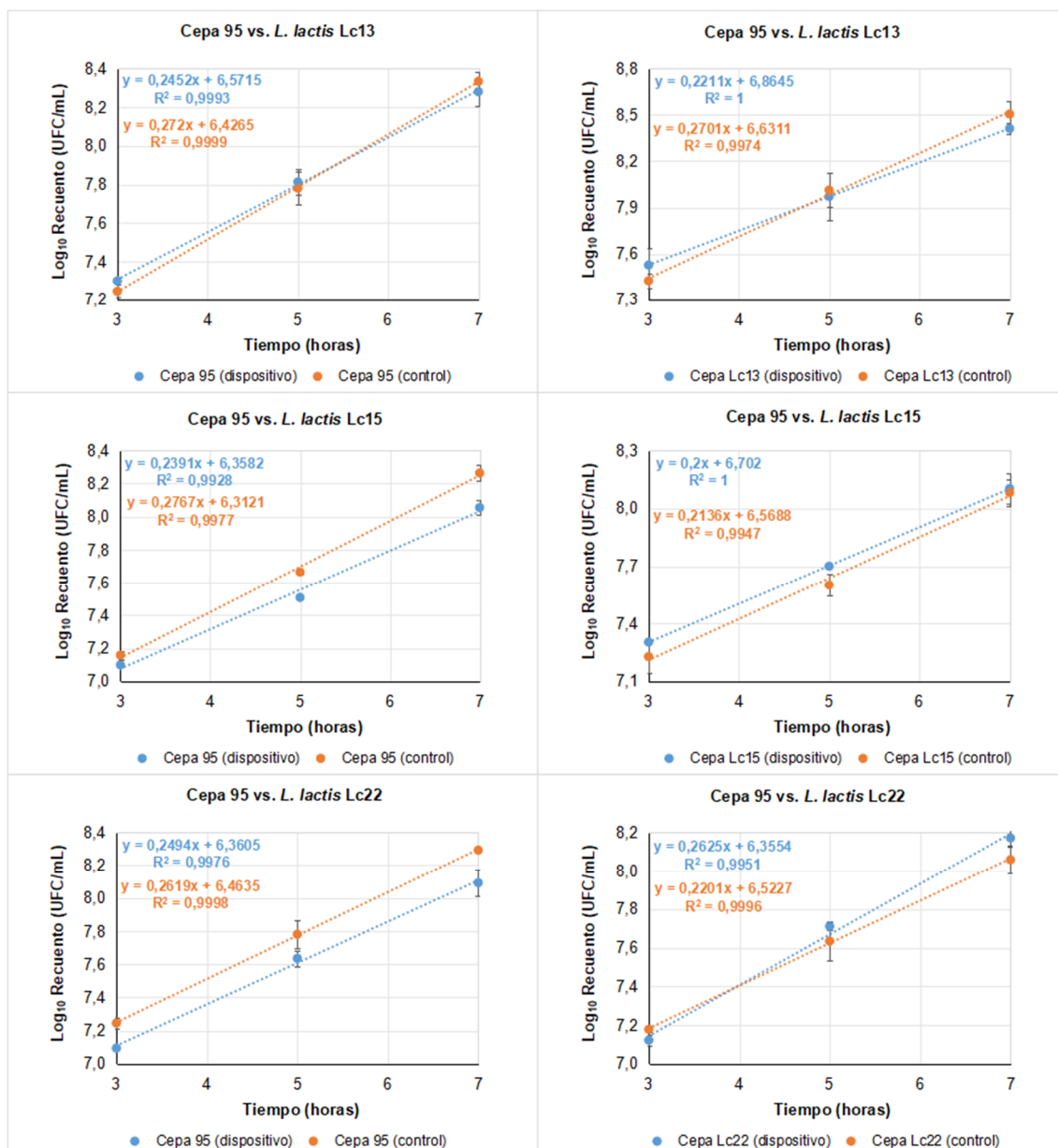


**Figura 1 (continuación):** Gráficas de linealización realizadas a partir de los datos de recuento bacteriano (UFC/mL) correspondientes a la fase de crecimiento exponencial de la cepa 26 y cepas BAL comerciales al ser confrontadas (dispositivo) y en ausencia de confrontación (control).

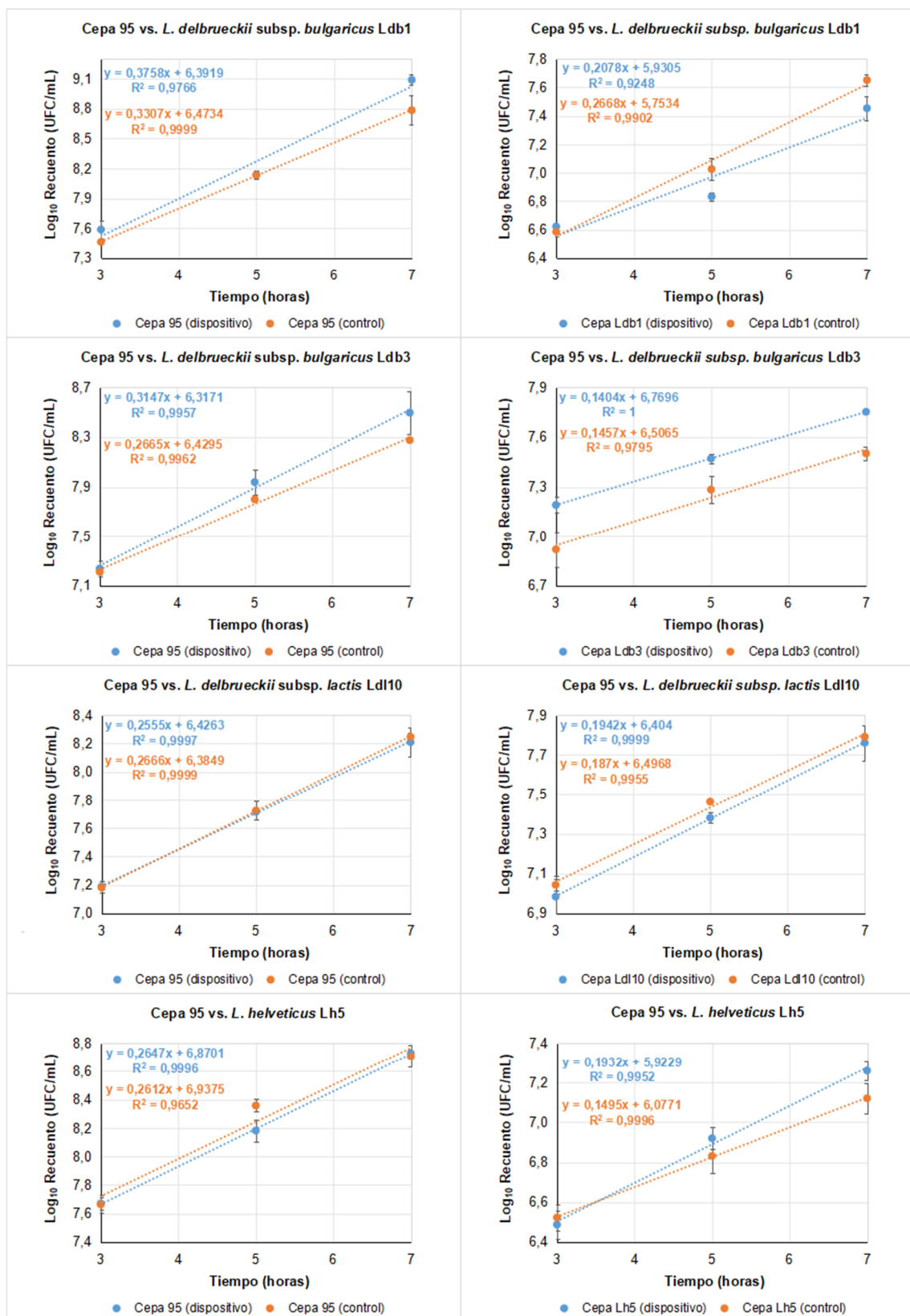


**Figura 2:** Gráficas de linealización realizadas a partir de los datos de recuento bacteriano (UFC/mL) correspondientes a la fase de crecimiento exponencial de la cepa 95 y cepas BAL comerciales al ser confrontadas (dispositivo) y en ausencia de confrontación (control).





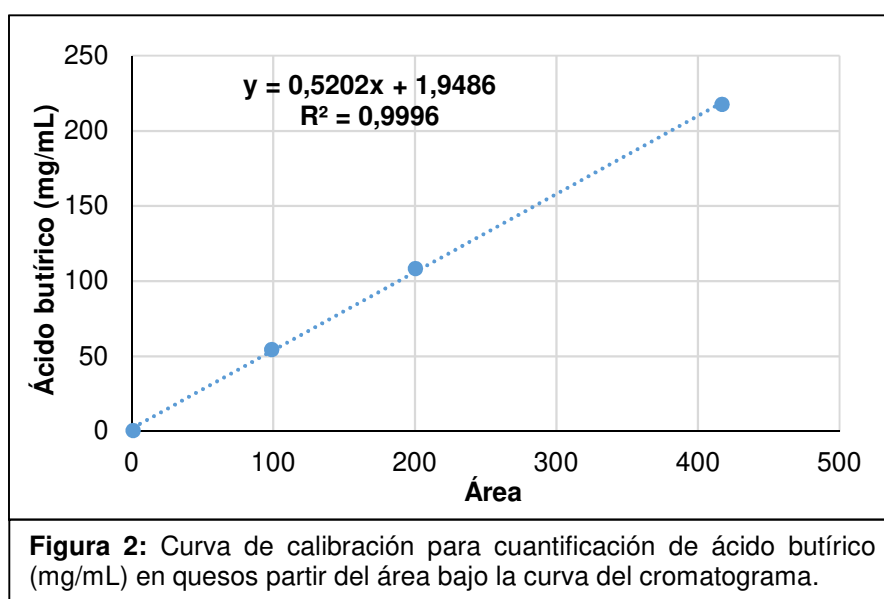
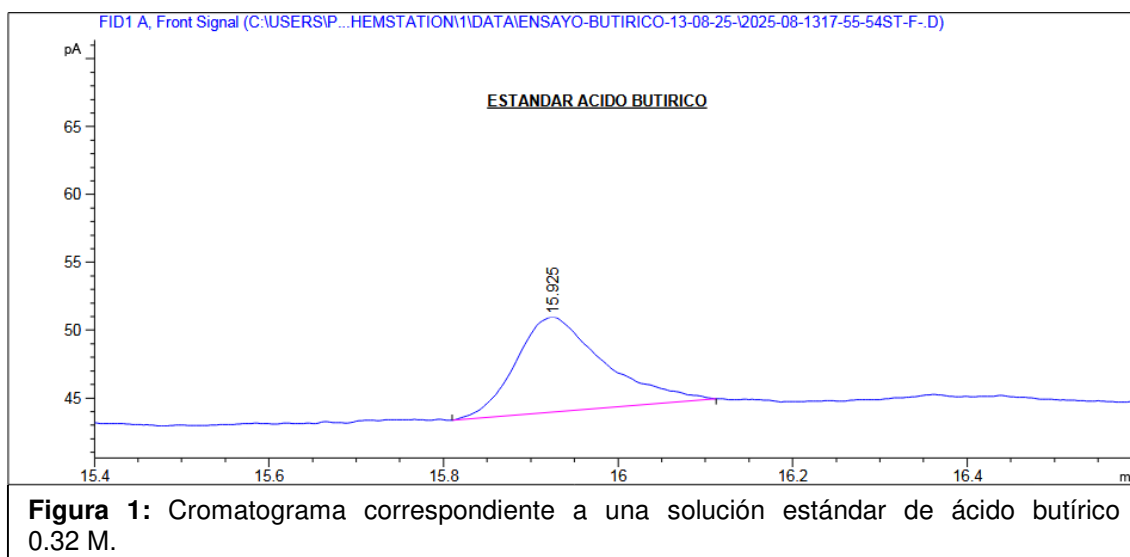
**Figura 2 (continuación):** Gráficas de linealización realizadas a partir de los datos de recuento bacteriano (UFC/mL) correspondientes a la fase de crecimiento exponencial de la cepa 95 y cepas BAL comerciales al ser confrontadas (dispositivo) y en ausencia de confrontación (control).



**Figura 2 (continuación):** Gráficas de linealización realizadas a partir de los datos de recuento bacteriano (UFC/mL) correspondientes a la fase de crecimiento exponencial de la cepa 95 y cepas BAL comerciales al ser confrontadas (dispositivo) y en ausencia de confrontación (control).

### Anexo III

#### 1. Estudio de la actividad anticlostridial de las cepas 26 y 95 en queso tipo Dambo



## Anexo IV

### 1. Secuenciación de los genomas bacterianos y análisis bioinformático

<b>Tabla 1:</b> Clasificación de proteínas ortólogas codificadas en el genoma de la cepa 26, según función biológica (categorías COG).			
<b>Categoría COG</b>	<b>Proteínas funcionales ortólogas</b>	<b>Categoría COG</b>	<b>Proteínas funcionales ortólogas</b>
C	90	H	61
CH	4	HI	1
CO	4	I	48
CP	2	IQ	11
D	43	J	163
E	145	JKL	1
EG	4	K	220
EGP	27	KL	1
EH	7	L	136
EJ	1	LU	1
EK	1	M	124
EM	1	MU	1
EP	4	N	6
EQ	1	NOT	1
ET	3	NU	4
F	102	O	49
FG	2	P	107
FJ	1	Q	11
FP	2	S	512
G	252	T	35
GK	2	U	37
GKT	3	UW	2
GM	3	V	83
GT	3	Sin asignación	268

**Tabla 2:** Clasificación de proteínas ortólogas codificadas en el genoma de la cepa 95, según función biológica (categorías COG).

Categoría COG	Proteínas funcionales ortólogas	Categoría COG	Proteínas funcionales ortólogas
C	99	I	44
CH	3	IQ	11
CO	4	J	164
CP	2	JKL	1
D	46	K	198
E	138	KL	1
EG	5	KLT	2
EGP	27	KT	4
EH	7	L	177
EJ	1	LM	1
EK	1	LU	1
EM	1	M	129
EP	3	MU	1
EQ	1	N	4
ET	3	NOT	1
F	107	NU	4
FG	3	O	48
FJ	1	OU	1
FP	2	P	108
G	170	Q	13
GK	2	QT	1
GKT	1	S	545
GM	7	T	42
GT	3	U	36
H	51	V	98
HI	1	Sin asignación	301

**Tabla 3:** Sistema COG de clasificación de proteínas según sus funciones biológicas.

<b>Categoría COG</b>	<b>Función biológica</b>
<b>A</b>	Procesamiento y modificación del ARN
<b>B</b>	Estructura y dinámica de la cromatina
<b>C</b>	Producción y conversión de energía
<b>D</b>	Control del ciclo celular, división celular y partición cromosómica
<b>E</b>	Transporte y metabolismo de aminoácidos
<b>F</b>	Transporte y metabolismo de nucleótidos
<b>G</b>	Transporte y metabolismo de carbohidratos
<b>H</b>	Transporte y metabolismo de coenzimas
<b>I</b>	Transporte y metabolismo de lípidos
<b>J</b>	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis
<b>K</b>	Transcripción
<b>L</b>	Replicación, recombinación y reparación
<b>M</b>	Biogénesis de la pared, membrana o envoltura celular
<b>N</b>	Motilidad celular
<b>O</b>	Modificación postraducciona, recambio proteico y chaperonas
<b>P</b>	Transporte y metabolismo de iones inorgánicos
<b>Q</b>	Biosíntesis, transporte y carabolismo de metabolitos secundarios
<b>R</b>	Predicción de función general
<b>S</b>	Función desconocida
<b>T</b>	Mecanismos de traducción de señales
<b>U</b>	Tráfico intracelular, secreción y transporte vesicular
<b>V</b>	Mecanismos de defensa
<b>W</b>	Estructuras extracelulares
<b>X</b>	No asignado, sin categoría definida, error
<b>Y</b>	Estructura nuclear
<b>Z</b>	Citoesqueleto